



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118434843 A

(43) 申请公布日 2024.08.02

(21) 申请号 202280075101.8

(22) 申请日 2022.11.10

(30) 优先权数据

2021-184246 2021.11.11 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/041960 2022.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/085369 JA 2023.05.19

(71) 申请人 学校法人同志社

地址 日本京都府

申请人 真实眼株式会社

(72) 发明人 小泉范子 奥村直毅 松冈靖史

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 梅黎 蔡晓茵

(51) Int.Cl.

G12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 27/02 (2006.01)

G12N 1/04 (2006.01)

权利要求书5页 说明书30页 附图31页

(54) 发明名称

角膜内皮细胞的冷冻保存制剂及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供了冷冻保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂。本发明提供了保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,该方法包含:冷冻工序,该冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样冷冻的工序,其中在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段;和根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。

1. 保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,其包含:
冷冻工序,该冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的工序,其中在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于 1°C 的速度降低温度的阶段,以及
根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,包含将角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述在冷冻状态下维持的工序包含在冷冻维持温度下维持。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约 -80°C ~约 -10°C 的范围内的温度。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约 -196°C ~约 -10°C 的范围内的温度。
6. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约 -30°C 以下的温度。
7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟约 0.1°C ~约 0.9°C 的速度降低温度。
8. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟约 0.2°C ~约 0.8°C 的速度降低温度。
9. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟约 0.7°C 以下的速度降低温度。
10. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟约 0.2°C ~约 0.7°C 的速度降低温度。
11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约 0°C ~约 42°C 的范围内的温度。
12. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约 0°C ~约 37°C 的范围内的温度。
13. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约 4°C ~约 23°C 的范围内的温度。
14. 根据权利要求1~13中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序包含至少一个在约 $-20^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ 的至少一部分的温度范围中以每分钟小于 1°C 的速度降低温度的阶段。
15. 根据权利要求1~13中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序包含至少一个在约 $-20^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ 的温度范围维持一定时间以上的阶段。
16. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在包含小于约7%的DMSO的保存液中保存。
17. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在包含约5%以下的DMSO的保存液中保存。
18. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在包含约2%以下的DMSO的保存液中保存。
19. 根据权利要求1~15中任一项所述的方法,其中,将所述角膜内皮细胞和/或角膜内

皮样细胞在不含DMSO的保存液中保存。

20. 根据权利要求1~19中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序包含在ROCK抑制剂的存在下将角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述冷冻工序包含以第一速度使温度降低至第一目标温度,以及以第二速度使温度从第一目标温度降低至第二目标温度,该第一速度为每分钟小于1°C的速度,且比该第二速度慢。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,所述冷冻工序还包含在使温度降低至所述第一目标温度后,在所述第一目标温度下维持。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-20°C~约-5°C的范围内的温度。

24. 根据权利要求21或22所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-15°C~约-10°C的范围内的温度。

25. 根据权利要求21~24中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-20°C以下的温度。

26. 根据权利要求21~24中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-196°C~约-80°C的范围内的温度。

27. 根据权利要求21~26中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约0.5°C~约0.05°C的速度。

28. 根据权利要求21~26中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约0.3°C~约0.1°C的速度。

29. 根据权利要求21~28中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约0.5~约5°C的速度。

30. 根据权利要求21~28中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约1~约3°C的速度。

31. 生产角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂的方法,其包含:

冷冻工序,该冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞根据需与药学上可接受的成分混合并冷冻以生产冷冻制剂的工序,其中在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时,包含至少一个以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段,以及

根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的该冷冻制剂在冷冻状态下维持的工序。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中,还包含根据权利要求2~30中的任一项或多项所述的方法中记载的一个或多个特征。

33. 角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂,其通过根据权利要求1~32中任一项所述的方法制造。

34. 根据权利要求33所述的冷冻制剂,其包含约 1×10^5 ~约 3×10^6 个所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

35. 根据权利要求33或34所述的冷冻制剂,其中,所述冷冻制剂的体积为约50 μ L~约600 μ L。

36. 根据权利要求33~35中任一项所述的冷冻制剂,其特征在于,所述冷冻制剂每一次

给与约50 μ L~约350 μ L。

37. 保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的装置,其中,该装置包含:

容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;

温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和

温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

该温度控制部能够进行指令以进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1 $^{\circ}$ C的速度改变温度的阶段,根据需要,能够进行指令以将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

38. 程序,其是编码安装在计算机中的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1 $^{\circ}$ C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

39. 记录介质,其存储有程序,该程序是编码安装在计算机中的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,

该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时至少包含一个以每分钟小于1 $^{\circ}$ C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

40. 冷冻制剂,其中,包含小于7%的DMSO与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

41. 能够在解冻后直接给与眼睛的冷冻制剂,其中,包含小于7%的DMSO与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

42. 冷冻制剂,其中,在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含小于7%的DMSO与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

43. 冷冻制剂,其中,在冷冻状态下包含小于7%的DMSO、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、与生理盐水的成分。

44. 冷冻制剂,其中,在冷冻状态下包含小于7%的DMSO、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、与培养基成分。

45. 具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,其中,包含小于7%的DMSO与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

46. 根据权利要求40~45中任一项所述的冷冻制剂,其中,包含约5%以下的DMSO。

47. 根据权利要求40~45中任一项所述的冷冻制剂,其中,包含约2%以下的DMSO。
48. 根据权利要求40~45中任一项所述的冷冻制剂,其中不含DMSO。
49. 根据权利要求40~48中任一项所述的冷冻制剂,其中,还包含ROCK抑制剂。
50. 根据权利要求49所述的冷冻制剂,其中,所述ROCK抑制剂为Y-27632。
51. 冷冻制剂,其中,在冷冻状态下包含ROCK抑制剂与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
52. 冷冻制剂,其中,在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、与生理盐水的成分。
53. 冷冻制剂,其中在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、与培养基成分。
54. 具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,其中该制剂包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞与ROCK抑制剂。
55. 根据权利要求54所述的制剂,其中,所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的存活率是在解冻后在室温下至少6小时至少80%的存活率。
56. 冷冻制剂,其是不抑制在解冻后给与的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的植入和在生物体内的存活的冷冻制剂,其中,该制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞与ROCK抑制剂。
57. 冷冻制剂,其中在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含小于7%的DMSO、与ROCK抑制剂、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
58. 根据权利要求50~57中任一项所述的制剂,其中,所述ROCK抑制剂为Y-27632。
59. 根据权利要求50~56中任一项所述的制剂,其中,包含小于约7%的DMSO。
60. 根据权利要求50~56中任一项所述的制剂,其中,包含约5%以下的DMSO。
61. 根据权利要求50~56中任一项所述的制剂,其中,包含约2%以下的DMSO。
62. 根据权利要求50~56中任一项所述的制剂,其中不含DMSO。
63. 根据权利要求30~52中任一项所述的制剂,其中,所述制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含所述细胞。
64. 根据权利要求30~53中任一项所述的制剂,其中,所述制剂是从非冷冻温度以每分钟小于1°C的速度降低温度而冷冻了的制剂。
65. 根据权利要求40~64中任一项所述的制剂,其特征在于,所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞用于细胞注入疗法。
66. 根据权利要求40~65中任一项所述的制剂,其特征在于,所述冷冻制剂在解冻后,不进行进一步的加工或培养而给与。
67. 根据权利要求40~66中任一项所述的制剂,其中包含约 1×10^5 ~约 3×10^6 个所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
68. 根据权利要求40~67中任一项所述的制剂,其中,所述冷冻制剂的体积为约50 μ L~约600 μ L。
69. 根据权利要求40~68中任一项所述的制剂,其特征在于,所述制剂每一次给与约50 μ L~约350 μ L。
70. 冷冻制剂试剂盒,其包含:容纳在冷冻状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样

细胞的冷冻制剂的容器,和维持冷冻状态的同时、容纳该容器的容纳器。

71. 根据权利要求70所述的冷冻制剂试剂盒,其中,所述冷冻制剂是根据权利要求30~59中任一项所述的制剂。

72. 冷冻制剂试剂盒,其包含:根据权利要求40~69中任一项所述的制剂、容纳该制剂的容器,和在冷冻状态下维持该制剂的同时、容纳该容器的容纳器。

73. 冷冻制剂试剂盒,其包含容器和容纳该容器的容纳器,其中,使用该容器以容纳根据权利要求40~69中任一项所述的制剂,使用该容纳器以在冷冻状态下维持该制剂。

74. 冷冻制剂试剂盒,其包含:容纳冷冻制剂的容器和在维持冷冻状态的同时容纳该容器的容纳器,所述冷冻制剂在冷冻状态下包含ROCK抑制剂与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

75. 包含容器和容纳该容器的容纳器的试剂盒的使用,其中,使用该容器以容纳根据权利要求40~69中任一项所述的制剂,使用该容纳器以将该制剂在冷冻状态下维持。

76. 根据权利要求40~69中任一项所述的制剂的运输和/或保存方法,其包含:将该制剂配置在包含容器和容纳该容器的容纳器的试剂盒的容器中的工序,和在冷冻状态下维持该试剂盒中的制剂的工序。

77. 进行角膜内皮细胞注入疗法的方法,其包含:
提供适合于该细胞注入疗法的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的工序;
冷冻工序,其中至少包含一个使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段;

将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持,根据需要向该注入疗法运输的工序;

将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞解冻的工序;以及
将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞给与受试体的工序。

角膜内皮细胞的冷冻保存制剂及其制造方法

技术领域

[0001] 本公开涉及角膜内皮细胞的冷冻保存制剂及其制造方法的技术以及使用了该技术的治疗等的应用技术。

背景技术

[0002] 若角膜内皮细胞受损,则角膜混浊,带来由大泡性角膜病变(水疱性角膜症)导致的严重的视力障碍。针对大泡性角膜病变的唯一治疗方法是角膜移植,但存在供体不足、排斥反应等问题,期望开发新的再生医学治疗。在同志社大学,确立了在Rho-associated coiled-coil forming kinase:Rho结合激酶(ROCK)抑制剂的存在下使由供体角膜分离的角膜内皮细胞增殖,通过向很多患者注入该细胞来再生角膜内皮的治疗方法。但是,由于能够在保持细胞品质的状态下保存的时间有限,所以在向日本全国、世界供给细胞方面存在很大的问题。一般来说,细胞可以在包含10%二甲基亚砜(DMSO)的保存液中冷冻保存,但在再生医疗的情况下具有DMSO对细胞的毒性、向眼睛给与时的刺激性的担心,因此期望降低DMSO的浓度而冷冻。

[0003] 另外,用于再生医疗的细胞冷冻制剂包含至少7%以上的DMSO,在向患者给与时,担心DMSO对患者的毒性,而在即将给与前用生理盐水稀释、或者使静脉滴注等给与时的给与速度极慢,由此避免向患者给与高浓度的DMSO。

[0004] 在角膜内皮细胞注入疗法中,需要向患者眼睛的前房部以400 μ L以下的少的用量给与高浓度的细胞悬浮液,因此不能在给与前稀释,需要降低了DMSO浓度或不含DMSO的细胞冷冻保存制剂。

发明内容

[0005] 用于解决课题的方案

[0006] 本发明人等详细研究了冷冻保存时的温度条件等,发现通过在比-1 $^{\circ}$ C/分钟慢的低速下的温度下降,在降低了DMSO浓度(例如小于7%)或者不含DMSO的冷冻保存液中保持高的角膜内皮细胞的存活率。本发明人等进而发现,首先以缓慢的速度降低温度、然后加快冷却速度使其冷冻的情况下,细胞存活率升高。因此,本发明提供了在降低了DMSO浓度或不含DMSO的冷冻保存液中的角膜内皮细胞的冷冻方法和可直接给与患者的细胞冷冻制剂的制造方法。

[0007] 本申请发明例如提供以下项目。

[0008] (项目1)保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,其包含:

[0009] 冷冻工序,其是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的工序,其中在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时,包含至少一个以每分钟小于1 $^{\circ}$ C的速度降低温度的阶段,以及

[0010] 根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。

[0011] (项目2)

[0012] 根据上述项目所述的方法,其中,包含将角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。

[0013] (项目3)

[0014] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述在冷冻状态下维持的工序包含在冷冻维持温度下维持。

[0015] (项目4)

[0016] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约-80°C ~ 约-10°C的范围内的温度。

[0017] (项目5)

[0018] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约-196°C ~ 约-10°C的范围内的温度。

[0019] (项目6)

[0020] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻维持温度为约-30°C以下的温度。

[0021] (项目7)

[0022] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,对于所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞,从非冷冻温度以每分钟约0.1°C ~ 约0.9°C的速度降低温度。

[0023] (项目8)

[0024] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,对于所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞,从非冷冻温度以每分钟约0.2°C ~ 约0.8°C的速度降低温度。

[0025] (项目9)

[0026] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,对于所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞,从非冷冻温度以每分钟约0.7°C以下的速度降低温度。

[0027] (项目10)

[0028] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,对于所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞,从非冷冻温度以每分钟约0.2°C ~ 约0.7°C的速度降低温度。

[0029] (项目11)

[0030] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约0°C ~ 约42°C的范围内的温度。

[0031] (项目12)

[0032] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约0°C ~ 约37°C的范围内的温度。

[0033] (项目13)

[0034] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述非冷冻温度为约4°C ~ 约23°C的范围内的温度。

[0035] (项目14)

[0036] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述冷冻工序包含至少一个在约-20°C ± 10°C的至少一部分温度范围中以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段。

[0037] (项目15)

- [0038] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序包含至少一个在约-20°C ±10°C的温度范围维持一定时间以上的阶段。
- [0039] (项目16)
- [0040] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞保存在包含小于约7%的DMSO的保存液中。
- [0041] (项目17)
- [0042] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞保存在包含约5%以下的DMSO的保存液中。
- [0043] (项目18)
- [0044] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞保存在包含约2%以下的DMSO的保存液中。
- [0045] (项目19)
- [0046] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞保存在不含DMSO的保存液中。
- [0047] (项目20)
- [0048] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中所述冷冻工序包含在ROCK抑制剂的存在下冷冻角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
- [0049] (项目21)
- [0050] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序包含以第一速度将温度降低至第一目标温度,以及以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度,该第一速度为每分钟小于1°C的速度,且比该第二速度慢。
- [0051] (项目22)
- [0052] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序还包含在将温度降低至所述第一目标温度后,在所述第一目标温度下维持。
- [0053] (项目23)
- [0054] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-20°C ~ 约-5°C的范围内的温度。
- [0055] (项目24)
- [0056] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-15°C ~ 约-10°C的范围内的温度。
- [0057] (项目25)
- [0058] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-20°C以下的温度。
- [0059] (项目26)
- [0060] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-196°C ~ 约-80°C的范围内的温度。
- [0061] (项目27)
- [0062] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约0.5°C ~ 约0.05°C的速度。

[0063] (项目28)

[0064] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约 0.3°C ~约 0.1°C 的速度。

[0065] (项目29)

[0066] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约 0.5 ~约 5°C 的速度。

[0067] (项目30)

[0068] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约 1 ~约 3°C 的速度。

[0069] (项目31)

[0070] 生产角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂的方法,其包含:

[0071] 冷冻工序,其是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞根据需要与药学上可接受的成分混合并冷冻以生产冷冻制剂的工序,其中在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时,包含至少一个以每分钟小于 1°C 的速度降低温度的阶段,以及

[0072] 根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的该冷冻制剂在冷冻状态下维持的工序。

[0073] (项目32)

[0074] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,还包含项目2~30中的任一项或多项所述的方法中记载的一个或多个特征。

[0075] (项目33) 角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂,其通过上述项目中任一项所述的方法制造。

[0076] (项目34)

[0077] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其包含约 1×10^5 ~约 3×10^6 个所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0078] (项目35)

[0079] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其中,所述冷冻制剂的体积为约 $50\mu\text{L}$ ~约 $600\mu\text{L}$ 。

[0080] (项目36)

[0081] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其特征在于,所述冷冻制剂每一次给与约 $50\mu\text{L}$ ~约 $350\mu\text{L}$ 。

[0082] (项目37)

[0083] 保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的装置,其中,该装置包含:

[0084] 容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;

[0085] 温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和

[0086] 温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

[0087] 该温度控制部能够进行指令以进行温度控制,以在将温度从非冷冻温度降低到冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于 1°C 的速度改变温度的阶段,根据需要,能够进行

指令以将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0088] (项目38)

[0089] 程序,其是编码安装在计算机中的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

[0090] 对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1°C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0091] (项目39)

[0092] 记录介质,其存储有程序,该程序是编码在计算机中安装的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,

[0093] 该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,

[0094] 对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低到冷冻目标温度时,至少包含一个以每分钟小于1°C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0095] (项目40)

[0096] 冷冻制剂,其包含小于7%的DMSO、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0097] (项目41)

[0098] 能够在解冻后直接给与眼睛的冷冻制剂,其包含小于7%的DMSO、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0099] (项目42)

[0100] 冷冻制剂,其在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含小于7%的DMSO、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0101] (项目43)

[0102] 冷冻制剂,其在冷冻状态下包含小于7%的DMSO、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和生理盐水的成分。

[0103] (项目44)

[0104] 冷冻制剂,其在冷冻状态下含有小于7%的DMSO、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和培养基成分。

[0105] (项目45)

[0106] 具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,其包含小于7%的DMSO和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0107] (项目46)

[0108] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其包含约5%以下的DMSO。

- [0109] (项目47)
- [0110] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其包含约2%以下的DMSO。
- [0111] (项目48)
- [0112] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其不含DMSO。
- [0113] (项目49)
- [0114] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其进一步包含ROCK抑制剂。
- [0115] (项目50)
- [0116] 根据上述项目中任一项所述的冷冻制剂,其中,所述ROCK抑制剂为Y-27632。
- [0117] (项目51)
- [0118] 冷冻制剂,其在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
- [0119] (项目52)
- [0120] 冷冻制剂,其包含ROCK抑制剂、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和生理盐水的成分。
- [0121] (项目53)
- [0122] 冷冻制剂,其在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和培养基成分。
- [0123] (项目54)
- [0124] 具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,其中,该制剂包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和ROCK抑制剂。
- [0125] (项目55)
- [0126] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的存活率是在解冻后在室温下至少6小时至少80%的存活率。
- [0127] (项目56)
- [0128] 冷冻制剂,其是不抑制在解冻后给与的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的移植和在生物体内的存活的冷冻制剂,其中,该制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞与ROCK抑制剂。
- [0129] (项目57)
- [0130] 冷冻制剂,其在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含小于7%的DMSO、与ROCK抑制剂、与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
- [0131] (项目58)
- [0132] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,所述ROCK抑制剂为Y-27632。
- [0133] (项目59)
- [0134] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,包含小于约7%的DMSO。
- [0135] (项目60)
- [0136] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,包含约5%以下的DMSO。
- [0137] (项目61)
- [0138] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,包含约2%以下的DMSO。
- [0139] (项目62)

- [0140] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中不含有DMSO。
- [0141] (项目63)
- [0142] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,所述制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含所述细胞。
- [0143] (项目64)
- [0144] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中,所述制剂是从非冷冻温度以每分钟小于1°C的速度降低温度而冷冻了的制剂。
- [0145] (项目65)
- [0146] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其特征在于,所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞用于细胞注入疗法。
- [0147] (项目66)
- [0148] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其特征在于,所述冷冻制剂在解冻后,不进行进一步的加工或培养而给与。
- [0149] (项目67)
- [0150] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其中包含约 1×10^5 ~ 约 3×10^6 个所述角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。
- [0151] (项目68)
- [0152] 如项目40 ~ 67中任一项所述的制剂,其中,所述冷冻制剂的体积为约50 μ L ~ 约600 μ L。
- [0153] (项目69)
- [0154] 根据上述项目中任一项所述的制剂,其特征在于,所述制剂每一次给与约50 μ L ~ 约350 μ L。
- [0155] (项目70)
- [0156] 冷冻制剂试剂盒,其包含:容纳在冷冻状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂的容器,和维持冷冻状态的同时、容纳该容器的容纳器。
- [0157] (项目71)
- [0158] 根据项目70所述的冷冻制剂试剂盒,其中,所述冷冻制剂是上述项目中任一项所述的制剂。
- [0159] (项目72)
- [0160] 冷冻制剂试剂盒,其包含:根据上述项目中任一项所述的制剂、容纳该制剂的容器,和在冷冻状态下维持该制剂的同时、容纳该容器的容纳器。
- [0161] (项目73)
- [0162] 冷冻制剂试剂盒,其包含容器和容纳该容器的容纳器,其中,
- [0163] 使用该容器以容纳上述项目中任一项所述的制剂,使用该容纳器以将该制剂在冷冻状态下维持。
- [0164] (项目74)
- [0165] 冷冻制剂试剂盒,其包含容纳冷冻制剂的容器和在维持冷冻状态的同时容纳该容器的容纳器,所述冷冻制剂在冷冻状态下包含ROCK抑制剂与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

- [0166] (项目75)
- [0167] 包含容器和容纳该容器的容纳器的试剂盒的使用,其中,
- [0168] 使用该容器以容纳上述项目中任一项所述的制剂,使用该容纳器以将该制剂在冷冻状态下维持。
- [0169] (项目76)
- [0170] 上述项目中任一项所述的制剂的运输和/或保存方法,其包含:
- [0171] 将该制剂配置在包含容器和容纳该容器的容纳器的试剂盒的容器中的工序,和
- [0172] 将该试剂盒中的制剂在冷冻状态下维持的工序。
- [0173] (项目77)
- [0174] 进行角膜内皮细胞注入疗法的方法,其包含:
- [0175] 提供适合于该细胞注入疗法的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的工序;
- [0176] 冷冻工序,其中至少包含一个使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段;
- [0177] 将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持,根据需要向该注入疗法运输的工序;
- [0178] 将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞解冻的工序;以及
- [0179] 将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞给与受试体的工序。
- [0180] (项目1A)
- [0181] 保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,其中,该方法包含:
- [0182] 冷冻工序,其是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的工序,其中包含以第一速度将温度降低至第一目标温度、和以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度;和
- [0183] 根据需要,将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序,
- [0184] 该第一速度为每分钟小于1°C的速度,并且比该第二速度慢。
- [0185] (项目2A)
- [0186] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述冷冻工序进一步包含在将温度降低至所述第一目标温度后,在所述第一目标温度下维持。
- [0187] (项目3A)
- [0188] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-20°C~约-5°C的范围内的温度。
- [0189] (项目4A)
- [0190] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一目标温度为约-15°C~约-10°C的范围内的温度。
- [0191] (项目5A)
- [0192] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-20°C以下的温度。
- [0193] (项目6A)
- [0194] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二目标温度为约-196°C~约-80°C的范围内的温度。

[0195] (项目7A)

[0196] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约 0.5°C ~约 0.05°C 的速度。

[0197] (项目8A)

[0198] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第一速度为每分钟约 0.3°C ~约 0.1°C 的速度。

[0199] (项目9A)

[0200] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约 0.5 ~约 5°C 的速度。

[0201] (项目10A)

[0202] 根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述第二速度为每分钟约 1 ~约 3°C 的速度。

[0203] 在本公开中,意图除了明确公开的组合之外,而且还可以组合上述一个或多个特征来提供。本公开的进一步的实施方式和优点只要根据阅读并理解以下的详细说明,就可以被本领域技术人员所认识到。

[0204] 发明的效果

[0205] 根据本公开,提供了角膜细胞冷冻制剂,其在融化后可直接给与眼睛。根据本发明,也可以将角膜内皮细胞向日本全国及海外提供。

[0206] 附图的简单说明

[0207] 图1示出了实施例1的概要。

[0208] 图2示出了实施例1中使用的细胞的培养形态的照片。

[0209] 图3示出了在改变了以4%人血清白蛋白和10%甘油为基础成分时的DMSO浓度的冷冻保存液中保存,将融化后的细胞的存活率进行比较的图表。

[0210] 图4示出了在改变了以4%人血清白蛋白和10%聚乙二醇为基础成分时的DMSO浓度的冷冻保存液中保存,将融化后的细胞的存活率进行了比较的图表。

[0211] 图5示出了将从 23°C 以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 、 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻的细胞在融化后的存活率进行了比较的数据。误差棒表示平均 \pm SD。统计学上的显著性差异基于Dunnett-t检验(vs未冷冻)($n=3$,** $p<0.05$)。

[0212] 图6示出了从 4°C 以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻并保存,将在保存后接种第7天的细胞密度进行了比较的数据。

[0213] 图7示出了实施例2的概要。

[0214] 图8示出了在添加有10%或5%的DMSO的培养基中培养的细胞的相位差显微镜图像。

[0215] 图9示出了在含有2%的DMSO或不含有DMSO的培养基中培养的细胞的相位差显微镜图像。

[0216] 图10是表示回收再接种后的细胞并调查了存活率的结果的图表。从各组的左侧开始,表示DMSO 10%、5%、2%和0%。

[0217] 图11示出了实施例3的概要。

[0218] 图12示出了将在含有10%DMSO的Cryostor CS10中冷冻的细胞在室温下放置0小

时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。

[0219] 图13示出了将在含有5%DMSO的Cryostor CS5中冷冻的细胞在室温下放置0小时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。

[0220] 图14示出了将在含有2%DMSO的Cryostor CS2中冷冻的细胞在室温下放置0小时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。

[0221] 图15示出了表示回收再接种后的细胞并调查存活率的结果的图表。从各组的左侧起表示CS10、CS5和CS2。

[0222] 图16示出了将在冷藏箱中保存了5天的细胞融化时的存活率和细胞回收率。误差棒表示平均±SD。统计学上的显著性差异基于Student T检验(n=3)。

[0223] 图17示出了在冷藏箱中保存后培养2天的细胞的显微镜照片。

[0224] 图18示出了注入了在冷藏箱中保存后的细胞的兔眼的照片。

[0225] 图19示出了细胞注入后第1天的角膜内皮的CD166的免疫组织染色的照片。

[0226] 图20示出了细胞注入后第1天的ZO-1和Na/K ATPase的免疫组织染色的照片。

[0227] 图21示出了细胞注入后第5天的角膜内皮的CD166、ZO-1和Na/K ATPase的免疫组织染色的照片。

[0228] 图22示出了实施例6的已知成分在冷冻保存液中的冷冻保存的概要。

[0229] 图23示出了在改变了以4%人血清白蛋白和10%甘油为基础成分时的DMSO浓度的冷冻保存液中以-1°C/分钟、-0.7°C/分钟、-0.5°C/分钟或-0.2°C的冷却速度进行冷冻,将融化后的细胞的存活率进行了比较的图表。

[0230] 图24示出了实施例6的市售冷冻保存液中的冷冻保存的概要。

[0231] 图25示出了在市售的冷冻保存液中,从4°C以-0.7°C/分钟的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率和回收率。

[0232] 图26示出了将在市售的冷冻保存液中从4°C以-1°C/分钟或-0.7°C/分钟的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率进行比较的数据。

[0233] 图27示出了将在市售的冷冻保存液中从4°C以-0.5°C/分钟或-0.2°C/分钟的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率进行比较的数据。

[0234] 图28示出了实施例7中保存的细胞的细胞存活率。

[0235] 图29示出了以-0.5°C/min冷却至-80°C时的温度的推移。

[0236] 图30示出了以-0.5°C/min冷却至-10°C,在-10°C下维持110分钟,然后以-1.0°C/min冷却至-80°C时的温度的推移。

[0237] 图31示出了以-0.1°C/min冷却至-10°C,然后以-1.0°C/min冷却至-80°C时的温度的推移。

具体实施方式

[0238] 以下,对本公开进行说明。应当理解:在本说明书的全部内容中,只要没有特别提及,则单数形式的表达还包含其复数形式的概念。因此,应当理解:只要没有特别提及,则单

数形式的冠词(例如,在英语的情况下为“a”、“an”、“the”等)也包含其复数形式的概念。此外,应当理解:只要没有特别提及,则本说明书中使用的术语以在本领域中通常使用的意思使用。因此,只要没有另外定义,则本说明书中使用的所有专业术语和科学技术术语具有与本公开所属领域的本领域技术人员通常理解的含义相同的含义。在相矛盾的情况下,本说明书(包含定义)优先。在本说明书中,“约”是指后面跟着的值的 $\pm 10\%$ 。只要没有特别指明,表示组成的“%”在指代DMSO和人血清白蛋白(HSA)的情况下是指w/w%,在指代甘油和聚乙二醇的情况下是指v/v%。

[0239] (定义)

[0240] 在本说明书中,“角膜内皮细胞”以在本领域中使用的通常的意思使用。角膜是构成眼睛的层状组织之一,其是透明的,位于最接近外界的部分。角膜在人体中从外侧(体表面)起依次由5层形成,从外侧起由角膜上皮、鲍曼氏膜、固有层、Descemet膜(角膜内皮基底膜)以及角膜内皮构成。特别地,除非另外指明,否则除上皮和内皮以外的部分有时可统称为“角膜实质”,在本说明书中也是如此称呼。本说明书中,“HCEC”(human corneal endothelial cells)是人角膜内皮细胞的简称。

[0241] 在本说明书中,“角膜内皮样细胞”是指从干细胞分化而得的细胞、例如从iPS细胞等分化而得的细胞,其是具有与角膜内皮细胞实质相同的功能的细胞。从干细胞、例如胚胎干细胞(ES细胞)、诱导性多能干细胞(iPS细胞)等分化为角膜内皮样细胞的方法是本领域公知的(McCabe等,PLoS One.2015Dec 21;10(12):e0145266;Ali等,Invest Ophthalmol Vis Sci.2018May 1;59(6):2437-2444)。在典型的例子中,简单地说,使用细胞解离缓冲液(Life Technologies),在第0天以1:12稀释将iPS细胞接种到35mm基质胶涂层板(Corning)上(将80%汇流板(confluent plate)分为12个板)。在培养基(mTeSR1;STEMSELL Technologies Inc.)中使iPS细胞增殖4天。在第4天,将mTeSR1培养基在80%DMEM-F12(Life Technologies)、20%KSR(Life Technologies)、1%非必需氨基酸(Life Technologies)、1mM L-谷氨酰胺(STEMCELL Technologies,inc.)、0.1mM β -巯基乙醇(MilliporeSigma)和8ng/mL β FGF(MilliporeSigma)的基本培养基中,用包含500ng/mL人重组Noggin(R&D Systems,Minneapolis,MN,USA)和10 μ M的SB431542(MilliporeSigma)的Smad抑制剂培养基替换。在第6天,将Smad抑制剂培养基在80%DMEM-F12(Life Technologies)、20%KSR(Life Technologies)、1%非必需氨基酸(Life Technologies)、1mM L-谷氨酰胺(STEMCELL Technologies,inc.)、0.1mM β -巯基乙醇(MilliporeSigma)和8ng/mL β FGF(MilliporeSigma)的基本培养基中,用包含0.1 \times B27补充剂(Life Technologies)、10ng/mL源于重组人血小板的增殖因子-BB(PDGF-BB;PeproTech,Rocky Hill,NJ,USA)和10ng/mL重组人Dickkopf相关蛋白质-2(DKK-2;R&D Systems)的角膜培养基替换。在第7天,将分化中的CEC转移到新的基质胶涂层板(35mm)上,进而在角膜培养基中增殖13天。在第20天回收分化的CEC。上述例子是典型的例子,本领域技术人员也可以使用本领域公知的其他方法(Fukuta等,PLoS One.2014Dec 2;9(12):e112291;Hayashi等,Nature.2016Mar 17;531(7594):376-80)。另外,本领域技术人员可以适当调节该领域公知的方法的条件,制作角膜内皮样细胞。

[0242] “角膜内皮细胞”和“角膜内皮样细胞”可包含磁性体(例如铁)。例如,在将含有磁性物质的角膜内皮细胞注入前房内的情况下,通过磁力可以促使角膜的内侧(例如

Descemet膜)的吸引粘接(Patel等, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 May; 50 (5) : 2123-31; Mimura等, Exp Eye Res. 2003 Jun; 76 (6) : 745-51; 和Mimura等, Exp Eye Res. 2005 Feb; 80 (2) : 149-57)。“磁性体”是指被磁场磁化的物质,可以举出例如铁、钴、镍、铁氧体等。

[0243] 在本说明书中,细胞的“保存”是指为了任意目的(例如,细胞注入疗法或用于其的运输)而在容器中保管一定的期间,其是指在维持细胞的功能的同时在容器中维持而不使细胞增殖。保存不同于目的在于使细胞增殖的“培养”。另外,保存不是指在即将给与前将细胞移入注射器等容器中,也不指在给与前为了用时制备而暂时保持在容器内。“冷冻保存”是指在冷冻状态下保存。

[0244] 在本说明书中,“非冷冻温度”是指即使在该温度下维持也不会发生冷冻的温度,“冷冻目标温度”是指使本公开的方法的冷冻工序中的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻时的目标温度。“冷冻维持温度”是指用于将冷冻的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持一定期间的温度。如果目标细胞等的对象能够维持冷冻状态,则冷冻维持温度也可以变动。

[0245] 在本说明书中,“缓慢冷冻状态”是指通过冷冻工序冷冻的状态,所述冷冻工序包含至少一个以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段。

[0246] 在本说明书中,“解冻后长期稳定性”是指在解冻后于室温维持冷冻的细胞的情况下,维持至少6小时、至少80%细胞的存活率。

[0247] 在本说明书中,“冷冻制剂”是指在冷冻状态下保存的制剂,其是在解冻后适合于使用的形式或用时制备的形式的制剂。“用时制备”是指在即将给与之前通过追加药剂或用溶剂稀释来制备适合使用的制剂。

[0248] 在本说明书中,“加工”是指对于细胞或细胞群而言时,通过其特定的操作,细胞或细胞群的某些状态或性质变化,优选是指使细胞群的性质变化的、药剂追加、药剂处理或特定细胞的分离等的操作,或改变细胞密度的、利用了溶剂的稀释或浓缩等的操作。

[0249] 在本说明书中,“一定温度”是指处于设定温度的 $\pm 1^\circ\text{C}$ 的范围。

[0250] 在本说明书中,“角膜内皮的症状、障碍或疾病”是指在角膜内皮中发生的任何症状、障碍或疾病。例如,作为角膜内皮的症状、障碍或疾病,可列举Fuchs角膜内皮营养不良、角膜移植后障碍、角膜内皮炎、外伤、眼科手术后的障碍、眼科激光手术后的障碍、年龄增长、后部多形性角膜营养不良(PPD: posterior polymorphous dystrophy)、先天性遗传性角膜内皮营养不良(CHED: congenital hereditary endothelial dystrophy)和特发性角膜内皮障碍等,但不限于此。

[0251] 在本说明书中,“受试体”是指本公开的制剂的给与对象,作为受试体,可以举出哺乳动物(例如人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、猫、狗、牛、马、羊、猴子等),但优选灵长类,特别优选人。

[0252] 在本说明书中,“试剂盒”是指可提供通常应分为两个以上的区域来提供的部分(例如,检验剂、诊断剂、治疗剂、抗体、标记、说明书等)的单元。为了稳定性等,不应该混合来提供,而是以提供优选在即将使用前混合使用这样的组合物为目的时,优选该试剂盒的形式。或者,提供在溶液状态下不稳定的化合物时,需要在即将使用前用适当的溶剂溶解冻干的粉末而进行用时制备的情况下,优选试剂盒的形式。这样的试剂盒优选具有记载如何使用所提供的部分(例如检验剂、诊断剂、治疗剂)或应如何处理试剂的指示书或说明书,这

是有利的。

[0253] 在本说明书中，“程序”以在该领域中使用的通常含义使用，其按顺序记述了计算机应进行的处理，在日本国，在专利法上作为“物”来对待。所有的计算机都是按照程序运行的。在现代的计算机中，程序表现为广义的数据，储存在记录介质或存储装置中。

[0254] 在本说明书中，“记录介质”是储存了执行本公开的方法的程序的记录介质，只要能够记录程序，记录介质可以是任意的。例如，可以是可储存在内部的ROM、HDD、磁盘、USB存储器等闪存等的外部存储装置，但不限于此。

[0255] 在本说明书中，“系统”是指执行本公开的方法或程序的构成，本来是指用于实现目的的体系、组织，多个要素成体系地构成并相互影响，在计算机领域，是指硬件、软件、OS、网络等的整体构成。

[0256] 在本说明书中，“机器学习”是指在没有明确编程的情况下赋予计算机学习能力的技术。其是通过功能单元获得新的知识/技能或重构现有的知识/技能，而提高自身性能的过程。通过以从经验中学习这样的方式对计算机进行编程，可以减少对细节进行编程所需的很多工夫，在机器学习领域，对于构建能够谋求从经验中自动改善这样的计算机程序的方法进行讨论。作为数据分析/机器学习的作用，是与算法领域并列成为知识处理的基础的要素技术，通常与其他技术联合利用，联合的领域的知识(领域特定(领域特有)的知识；例如，医学领域)是必要的。作为其应用范围，有预测(收集数据，预测今后发生的事情)、探索(从收集的数据中发现某些引入注目的特征)、检定/记述(调查数据中各种要素的关系)等的作用。机器学习基于表示真实世界的目标达成度的指标，机器学习的使用者必须掌握真实世界中的目标。而且，在达到目的时，需要将变好这样的指标公式化。机器学习是反问题，答案是否解开是不明确的不良设定问题。学习的规则的行为不是确定性的，而是概率(或然)。需要在以残留某些无法控制的部分为前提的运用上下功夫，本发明的tailor-made法也是可以称为该解决手段的方法。观察训练时和运用时的性能指标，同时机器学习的利用者根据真实世界的目标依次取舍选择数据、信息也是有用的。

[0257] 作为机器学习，可以使用线性回归、逻辑回归、支持向量机等，以及通过进行交叉验证(也称为交叉检验、交叉确认。Cross Validation; CV)，可以计算各模型的判别精度。排序后，可以逐个增加特征量，与机器学习(线性回归、逻辑回归、支持向量机等)进行交叉验证，计算各模型的判别精度。由此，能够选择精度最高的模型。在本发明中，机器学习可以使用任意的机器学习，作为带教师的机器学习，可以利用线性、逻辑、支持向量机(SVM)等。

[0258] (优选的实施方式)

[0259] 虽然以下记载了优选的实施方式的说明，但应理解，该实施方式是本公开的示例，并且本公开的范围不限于这样的优选实施方式。应当理解，本领域技术人员还可以参考以下这样的优选实施例，容易地进行处于本公开的范围内的改变、变更等。对于这些实施方式，本领域技术人员可以适当地组合任意的实施方式。

[0260] (保存方法)

[0261] 对于角膜内皮细胞，在冷冻保存中，通过在含有10%的抑制冷冻时损伤的DMSO的保存液中冷冻，可以在维持高存活率的同时保存角膜内皮细胞。但是，由于担心DMSO对于细胞的毒性、对眼睛给与时的刺激性，因此本发明人等研究了在减少了DMSO的保存液中能够维持高存活率的保存条件，结果发现：通过在比-1℃/分钟慢的低速下的温度下降，可在降

低了DMSO浓度(例如,低于7%)或者不含DMSO的冷冻保存液中将角膜内皮细胞的存活率保持在高的程度。

[0262] 在冷却速度过慢的情况下,细胞外的水分先冷冻,由此细胞外的水分被除去,水分从细胞内流出。通过细胞内的溶质浓度的升高,给细胞存活带来有害的影响。在冷却速度过快的情况下,可以抑制水分从细胞内的流出,但在细胞内产生由冰晶导致的损伤,给存活带来有害的影响。细胞在冷冻保存中的冷却速度对细胞损伤有很大的影响。可以通过最佳的冷却速度而将该影响抑制到最小限度,推荐-1°C/分钟的冷却速度。对于角膜内皮细胞,通过在比-1°C/分钟慢的低速下的温度下降,可在减少了DMSO浓度(例如低于7%)或者不含DMSO的冷冻保存液中将角膜内皮细胞的存活率保持在高的程度,这是预料之外的。

[0263] 在一个方式中,本公开可提供保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,其包含将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的冷冻工序,该冷冻工序中,在将温度从冷冻温度变更为冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1°C的速度(以比-1°C/分钟慢的冷却速度)降低温度的阶段。

[0264] 在一个方式中,本公开可提供生产角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂的方法,其包含冷冻工序,该冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞根据需要与药学上可接受的成分混合并冷冻以生产冷冻制剂的工序,其在将温度从非冷冻温度改变为冷冻目标温度时至少包含一个以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段。

[0265] 在一部分实施方式中,比-1°C/分钟慢的冷却速度可以为每分钟约0.1°C~约0.9°C、优选为每分钟约0.2°C~约0.8°C、更优选为每分钟约0.2°C~约0.7°C的范围内的温度。在特定的实施方式中,比-1°C/分钟慢的冷却速度可以是-0.9°C/分钟、-0.8°C/分钟、-0.7°C/分钟、-0.6°C/分钟、-0.5°C/分钟、-0.4°C/分钟、-0.3°C/分钟、-0.2°C/分钟或-0.1°C/分钟。

[0266] 在一个实施方式中,达到冷冻目标温度(例如-80°C)为止的冷却速度可以是一定的,也可以不是一定的。在一部分实施方式中,本公开的方法至少包含在特定的温度区域以比-1°C/分钟慢的冷却速度降低温度的阶段,在使温度降低至冷冻目标温度为止的过程中,可以包含升高温度的阶段,也可以包含以比-1°C/分钟快的冷却速度降低温度的阶段,还可以包含在一定温度下维持的阶段。

[0267] 冷冻目标温度可适当设定,例如可以为约-20°C~-196°C的范围内的温度,例如可以为约-20°C、约-30°C、约-40°C、约-50°C、约-60°C、约-70°C、约-80°C、约-90°C、约-100°C、约-150°C、约-190°C或约-196°C。

[0268] 在一个实施方式中,本公开的方法只要在特定的温度区域以比-1°C/分钟慢的平均冷却速度降低温度,就也可以包含升高温度的阶段,也可以包含以比-1°C/分钟快的冷却速度降低温度的阶段,还可以包含在一定温度下维持的阶段。

[0269] 在一个实施方式中,本公开的方法可以通过在特定的温度区域以比-1°C/分钟快的速度降低温度后、在一定温度下维持并再次以比-1°C/分钟快的速度降低温度(可反复该过程)来实现比-1°C/分钟慢的平均冷却速度。

[0270] 在一个实施方式中,本公开的方法可以通过在特定的温度区域以比-1°C/分钟快的速度降低温度后、升高温度、接着在一定温度下维持、再次以比-1°C/分钟快的速度降低

温度(可反复该过程)来实现比-1°C/分钟慢的平均冷却速度。

[0271] 在一个实施方式中,本公开的方法可以通过在特定的温度区域以比-1°C/分钟快的速度降低温度后、升高温度、再次以比-1°C/分钟快的速度降低温度(可反复该过程)来实现比-1°C/分钟慢的平均冷却速度。

[0272] 在一个实施方式中,以比-1°C/分钟慢的冷却速度降低温度的特定的温度区域可以是至少包含至少从非冷冻状态向冷冻状态转变的温度的温度范围。在特定的实施方式中,上述温度区域可以为约-80°C~约0°C、约-70°C~约0°C、约-60°C~约0°C、约-50°C~约0°C、约-40°C~约0°C、约-30°C~约0°C、约-20°C~约0°C、约-10°C~约0°C、约-80°C~约-10°C、约-70°C~约-10°C、约-60°C~约-10°C、约-50°C~约-10°C、约-40°C~约-10°C、约-30°C~约-10°C、或者约-20°C~约-10°C。

[0273] 在一个实施方式中,本公开的方法可以进一步包含将角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序。在一些实施方式中,冷冻维持温度可以为约-196°C~约-4°C、约-196°C~约-10°C、约-196°C~约-20°C、约-196°C~约-30°C、约-196°C~约-40°C、约-196°C~约-50°C、约-196°C~约-60°C、约-196°C~约-70°C、约-196°C~约-80°C、约-80°C~约-4°C、约-80°C~约-10°C、约-80°C~约-20°C、约-80°C~约-30°C、约-80°C~约-40°C、约-80°C~约-50°C、约-80°C~约-60°C、或者约-80°C~约-70°C的范围内的温度。在优选的实施方式中,冷冻维持温度可包含在约-80°C维持。

[0274] 在一些实施方式中,本公开的方法的冷冻工序可从约0°C~约42°C、约0°C~约37°C、约4°C~约23°C、约4°C~约10°C的范围内的非冷冻温度开始。在优选的实施方式中,特别是在DMSO存在下冷冻的情况下,冷冻的工序可以从4°C的非冷冻温度开始。在特定的实施方式中,本公开的方法可以进一步包含在冷冻工序之前在上述非冷冻温度下孵育角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的工序。

[0275] 在一个实施方式中,本公开的方法的冷冻工序可包含至少一个在约-20°C±10°C的至少一部分的温度范围或整个范围以每分钟小于1°C的速度降低温度或在一定温度下维持一定时间的阶段。在一个实施方式中,本公开的方法的冷冻工序可包含至少一个在约-20°C±10°C的温度范围连续维持一定时间以上、例如20分钟以上、30分钟以上、40分钟以上、50分钟以上、1小时以上、1小时30分钟以上、或2小时以上的阶段。上述温度范围可以为-20°C±5°C。在冷冻工序中,如果在不均匀、未排列的状态下形成冰晶,则对细胞的损伤变大,可降低存活率。不希望受理论束缚,但在冷冻工序中,通过在冰晶和保存液中的溶质(例如NaCl)的共晶点附近(例如-20°C±10°C)缓慢地降低温度或在共晶点附近维持一定时间的温度,可以使晶体均匀排列,减轻对细胞的损伤。

[0276] 如果至少包含在-20°C±10°C的温度范围以每分钟小于1°C的速度降低温度或在一定温度下维持一定时间的阶段,则在-20°C±10°C的温度的温度范围外,可以以任何速度使温度变化。

[0277] 在进一步的方式中,本公开提供了保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,该方法包含冷冻工序和根据需要将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序,所述冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的工序,其中包含至少一个在约-20°C±10°C的温度范围维持一定时间以上的阶段。20°C±10°C的温度的温度范围之外可以以任何速度使温度变化。

[0278] 在一部分实施方式中,可以从-30°C降低温度,然后升高温度,在共晶点附近(-20°C±10°C)的温度范围缓慢地降低温度、或维持一定时间的温度。本领域技术人员鉴于本说明书的公开,只要起到本公开的效果,就可以对于在低于-30°C的温度下维持的时间进行适当调整,例如可以为2小时以下、1小时以下、30分钟以下、或20分钟以下。

[0279] 在一个实施方式中,可以将角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在包含小于约7%、约5%以下或约2%以下的DMSO的保存液中保存。保存液中所含的DMSO可对细胞产生不良影响,因此优选为约5%以下,更优选为约2%以下,最优选在保存液中不含DMSO。在特定的实施方式中,保存液中所含的DMSO可以为约5%。在特定的实施方式中,保存液中所含的DMSO可以为约2%

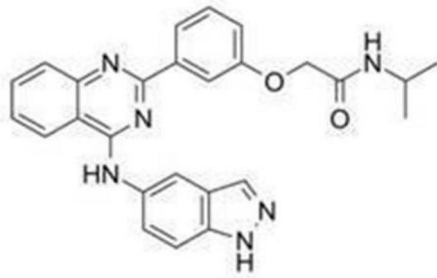
[0280] 在一个实施方式中,可以在ROCK抑制剂的存在下冷冻角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0281] 作为ROCK抑制剂,可列举下述文献:美国专利4678783号、专利第3421217号、国际公开第95/28387、国际公开99/20620、国际公开99/61403、国际公开02/076976、国际公开02/076977、国际公开第2002/083175、国际公开02/100833、国际公开03/059913、国际公开03/062227、国际公开2004/009555、国际公开2004/022541、国际公开2004/108724、国际公开2005/003101、国际公开2005/039564、国际公开2005/034866、国际公开2005/037197、国际公开2005/037198、国际公开2005/035501、国际公开2005/035503、国际公开2005/035506、国际公开2005/080394、国际公开2005/103050、国际公开2006/057270、国际公开2007/026664、国际公开2014/113620、国际公开2019/089868、国际公开2014/055996、国际公开2019/014300、国际公开2019/014304、国际公开2018/138293、国际公开2018/115383、国际公开2018/118109、国际公开2018/102325、国际公开2018/009622、国际公开2018/009625、国际公开2018/009627、国际公开2017/205709、国际公开2017/123860、国际公开2016/112236、国际公开2016/028971、国际公开2015/165341、国际公开2015/054317、国际公开2015/002926、国际公开2015/002915、国际公开2014/068035、国际公开2014/055996、国际公开2013/030366、国际公开2012/146724、国际公开2011/107608、国际公开2010/104851、国际公开2008/077550、国际公开2008/036540、国际公开2005/097790等中公开的化合物。所述化合物可以通过各自公开的文献中记载的方法制造。作为具体例,可列举1-(5-异喹啉磺酰基)高哌嗪或其盐(例如法舒地尔(1-(5-异喹啉磺酰基)高哌嗪)、(+)-反式-4-(1-氨基乙基)-1-(4-吡啶基氨基甲酰基)环己烷((R)-(+)-反式-4-(吡啶基)-4-(1-氨基乙基)环己烷甲酰胺)或其盐(例如Y-27632((R)-(+)-反式-4-(吡啶基)-4-(1-氨基乙基)环己烷甲酰胺二盐酸盐一水合物)等等,这些化合物也可以适合使用市售品(富士胶片和光纯药株式会社、旭化成フアーマ等)。

[0282] 在一些实施方式中,作为可使用的ROCK抑制剂,可举出Y-27632((+)-反式-4-(1-氨基乙基)-1-(4-吡啶基氨基甲酰基)环己烷)、瑞舒地尔(4-氟-5-[(2S)-2-甲基-1,4-二氮杂环庚烷-1-基]磺酰基)异喹啉)、法舒地尔(1-(5-异喹啉磺酰基)高哌嗪)、维罗舒地尔(N-(1,2-二氢-1-氧代-6-异喹啉基)- α -(二甲基氨基)-3-噻吩乙酰胺)、贝舒地尔(2-[3-[4-[(1H-吡唑-5-基)氨基]噻唑啉-2-基]苯氧基]-N-异丙基乙酰胺)及其药学上可接受的盐。贝舒地尔的结构如以下所述。

[0283] [化学式1]

[0284]



[0285] 在一些实施方式中,ROCK抑制剂可以是瑞舒地尔、Y-27632、法舒地尔、奈舒地尔(Netarsudil)、维罗舒地尔、贝舒地尔(Belumosudil)或其药学上可接受的盐,更优选可以是瑞舒地尔、Y-27632或其药学上可接受的盐。

[0286] (制剂)

[0287] 在另外的方式中,本公开可提供通过保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的上述方法、或生产角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂的上述方法制造的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的冷冻制剂。

[0288] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,其包含小于7%的DMSO、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0289] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,该冷冻制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含小于7%的DMSO、和角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0290] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,该冷冻制剂在冷冻状态下包含小于7%的DMSO、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和生理盐水的成分。

[0291] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,该冷冻制剂在冷冻状态下包含小于7%的DMSO、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和培养基成分。

[0292] 用于再生医疗的细胞冷冻制剂含有至少7%以上的DMSO,在给与患者时担心DMSO对患者的毒性,需要在即将给与前用生理盐水稀释、或者极为减缓点滴静注等给与时的给与速度,由此避免给与患者高浓度的DMSO。通过本公开的方法,即使在小于7%的经降低的DMSO浓度的保存液中保存,也维持了高存活率。本公开实现了包含小于7%的迄今为止未能实现的低浓度的DMSO的冷冻制剂。

[0293] 在一个方式中,本公开可提供具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,该制剂包含小于7%的DMSO与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0294] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,其在冷冻状态下包含ROCK抑制剂与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0295] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,其在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和生理盐水的成分(例如,NaCl)。

[0296] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,该冷冻制剂在冷冻状态下包含ROCK抑制剂、角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和培养基成分。本领域技术人员可以适当选择培养基成分。作为培养基成分,可以举出例如葡萄糖等碳源、氨基酸、维生素、电解质、磷酸盐、缓冲剂、生长因子、血清、血清白蛋白等,但不限于此。作为基础培养基成分中所含的氨基酸,没有特别限定,可以举出例如L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸等。作为基础培养基成分中含有的维生素类,没有特别限定,可以举出例

如D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、无旋光肌醇、烟酰胺、核黄素、硫胺素、吡哆醇、生物素、硫辛酸、维生素B₁₂、腺嘌呤、胸苷等。作为培养基成分中所含的电解质,没有特别限定,可以举出例如CaCl₂、KCl、MgSO₄、NaCl、NaH₂PO₄、NaHCO₃、Fe(NO₃)₃、FeSO₄、CuSO₄、MnSO₄、Na₂SiO₃、(NH₄)₆Mo₇O₂₄、NaVO₃、NiCl₂、ZnSO₄等。在用于细胞注入疗法的情况下,优选培养基实质上不含异源血清成分。这里,“异源血清成分”是指来源于与接受者为不同种类的生物的血清成分。例如,在接受者为人的情况下,源于牛或马的血清、例如胎牛血清(FBS、FCS)、小牛血清(CS)、马血清(HS)等属于异源血清成分。

[0297] 在一个方式中,本公开可提供具有解冻后长期稳定性的冷冻细胞制剂,该制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和ROCK抑制剂。

[0298] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂,其是不阻碍解冻后给与的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的植入(生着)和在生物体内的存活的冷冻制剂,该制剂在以缓慢冷冻状态冷冻了的状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞、和ROCK抑制剂。

[0299] 本公开的制剂可在解冻后直接给与眼睛。

[0300] 在一个实施方式中,制剂中包含的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的细胞数可以为约 1×10^5 ~ 约 3×10^6 个细胞,优选可以为约 5×10^5 ~ 约 1×10^6 个细胞。在特定的实施方式中,制剂中包含的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的细胞数例如可以是约 1×10^5 个细胞、约 2×10^5 个细胞、约 3×10^5 个细胞、约 4×10^5 个细胞、约 5×10^5 个细胞、约 6×10^5 个细胞、约 7×10^5 个细胞、约 8×10^5 个细胞、约 9×10^5 个细胞、约 1×10^6 个细胞、约 2×10^6 个细胞、约 3×10^6 个细胞、约 4×10^6 个细胞、或者约 5×10^6 个细胞。

[0301] 在一个实施方式中,制剂的液体量可以为约 $50\mu\text{l}$ ~ 约 $2000\mu\text{l}$ 、约 $50\mu\text{l}$ ~ 约 $1000\mu\text{l}$ 、约 $50\mu\text{l}$ ~ 约 $800\mu\text{l}$ 、约 $50\mu\text{l}$ ~ 约 $600\mu\text{l}$ 、约 $50\mu\text{l}$ ~ 约 $300\mu\text{l}$ 、约 $100\mu\text{l}$ ~ 约 $2000\mu\text{l}$,优选可以为约 $100\mu\text{l}$ ~ 约 $1000\mu\text{l}$,更优选可以为约 $200\mu\text{l}$ ~ 约 $800\mu\text{l}$,最优选可以为约 $300\mu\text{l}$ ~ 约 $600\mu\text{l}$,但可根据目的适当改变。作为产品规格,例如可以是基准量(例如 $300\mu\text{l}$)的 \pm 约5%、 \pm 约10%、 \pm 约15%、 \pm 约20%、 \pm 约25%、 \pm 约50%等。例如,制剂的液体量可以为至少约 $50\mu\text{l}$,例如可以为约 $100\mu\text{l}$ 、约 $200\mu\text{l}$ 、约 $300\mu\text{l}$ 、约 $400\mu\text{l}$ 、约 $500\mu\text{l}$ 、约 $600\mu\text{l}$ 、约 $700\mu\text{l}$ 、约 $800\mu\text{l}$ 、约 $900\mu\text{l}$ 、约 1ml 、约 2ml 、约 3ml 、约 4ml 、约 5ml 、约 6ml 、约 7ml 、约 8ml 、约 9ml 或约 10ml 。在一些实施方式中,在细胞注入疗法中,在意图要向两眼注入的情况下,作为产品规格,可以是给与量的2倍量、3倍量或4倍量。即使在不打算向两眼注入的情况下,作为产品规格,也可以是给与量的2倍量、3倍量或4倍量,以在给与失败时有所防备。液体量的范围可以将上述数值适当组合。

[0302] 在一个实施方式中,本公开的制剂可以每一次给与约 $50\mu\text{L}$ ~ 约 $350\mu\text{L}$,约 $250\mu\text{L}$ ~ 约 $350\mu\text{L}$ 、约 $300\mu\text{L}$ ~ 约 $350\mu\text{L}$ 或约 $300\mu\text{L}$ 。本公开的制剂可向前房内给与。

[0303] 本公开的制剂的细胞密度通常为约 2×10^4 个/ml以上。不希望被理论束缚,但在作为细胞注入用使用的情况下,若细胞密度过少,则不能期待治疗效果,若细胞密度过高,则细胞的重叠增加,由此有可能促进保存中的细胞死亡。因此,典型地,细胞密度可以在约 2×10^4 个/ml ~ 约 8×10^7 个/ml的范围内适当确定,优选可以为约 2×10^4 个/ml ~ 约 8×10^7 个/ml,更优选可以为约 2×10^5 个/ml ~ 约 8×10^6 个/ml,进一步优选可以为约 1×10^6 个/ml ~ 约 8×10^6 个/ml,最优选可以为约 2×10^6 个/ml ~ 约 4×10^6 个/ml。本领域技术人员可以根据用途适当地确定合适的细胞密度。例如,在保存的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞用于细胞

注入疗法的情况下,可以考虑保存的悬浮液的体积、最佳给与量、任选追加的ROCK抑制剂和所给与的悬浮液的体积等来确定保存的细胞密度,以减轻保存后调节密度的操作。典型地,最佳给与量可以为约 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞,优选可以为约 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞。本领域技术人员可以适当确定制剂中所含的细胞数、液体量和细胞密度,以达到最佳给与量。

[0304] 在一个实施方式中,角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞可被容纳在容器中。在一些实施方式中,作为容器,可使用任何容器,可举出例如板(12、24、48或96孔板)、管、小瓶(小玻璃瓶)、注射器和盘,但不限于此。本公开的方法无论容器的种类如何,都能够以高细胞存活率保存细胞。

[0305] 在一个实施方式中,制剂可包含小于约7%、约5%以下或约2%以下的DMSO。制剂优选包含约5%以下的DMSO,更优选包含约2%以下,最优选不含DMSO。在特定的实施方式中,制剂中所含的DMSO可以为约5%。在特定的实施方式中,制剂中所含的DMSO可以为约2%。

[0306] 在一个实施方式中,制剂可包含ROCK抑制剂。ROCK抑制剂如上所述。由于ROCK抑制剂促进细胞粘附,因此认为若从保存时开始在制剂中预先包含ROCK抑制剂,则可促进粘附,对于保存产生不良影响,因此典型地在即将给与之前将ROCK抑制剂添加到制剂中。然而,出乎意料地是,从保存时起预先将ROCK抑制剂包含在制剂中的情况下,保存后的细胞的存活率高,注入前房内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞植入角膜内皮并正常发挥功能(实施例5)。

[0307] 在一些实施方式中,角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的存活率可以是在解冻后在室温下至少6小时、至少80%、或者至少90%的存活率。在一些实施方式中,角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的存活率可以是在解冻后在室温下至少3小时至少90%的存活率。

[0308] 在另外的方式中,本公开提供了保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的方法,该方法包含:冷冻工序和根据需要将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持的工序,所述冷冻工序是将非冷冻状态的该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞冷冻的工序,其中包含以第一速度将温度降低至第一目标温度和以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度,第一速度是每分钟小于 1°C 的速度且比第二速度慢。“第一目标温度”是指维持过冷却状态的温度。第一目标温度优选在以比冷却至第一目标温度为止的冷却速度快的速度冷却的情况下,可以为冷冻开始时的温度。第二目标温度是指从第一目标温度进一步降低温度以最终达到目标的温度。本发明人等发现:通过在过冷却状态下以第一速度缓慢地降低温度至第一目标温度,变化为第二速度而开始冷冻、使温度降低至第二目标温度,由此细胞存活率进一步改善。所述方法可以具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0309] 在另外的方式中,冷冻工序可包含以第一速度将温度降低至第一目标温度,和以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度。第一速度是每分钟小于 1°C 的速度,其可以是比第二速度慢的速度。所述方法可以具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0310] 在一些实施方式中,冷冻工序可进一步包含在将温度降低至第一目标温度之后在第一目标温度下维持。在第一目标温度下维持的时间只要可维持过冷却状态即可,可适当设定,例如可以为约5分钟以上、约10分钟以上、约20分钟以上、约30分钟以上、约40分钟以上、约50分钟以上、约60分钟以上、约70分钟以上、约80分钟以上、约90分钟以上、约100分钟

以上、约110分钟以上、约120分钟以上、约150分钟以上、约180分钟以上,最大可以为约240分钟。

[0311] 第一目标温度只要是可维持过冷却状态的温度即可,例如可以是约-20°C~约-5°C的温度,优选为约-15°C~约-10°C的温度,更优选为-13°C~-10°C的温度。

[0312] 第二目标温度是低于第一目标温度的温度,其能够适当设定,例如可以是约-20°C以下的温度,优选为约-196°C~约-80°C的温度,更优选为约-196°C或约-80°C。

[0313] 第一速度只要是缓慢的速度即可,可以适当设定,例如可以是每分钟约0.9°C以下的速度,优选为每分钟约0.5°C~约0.05°C,更优选为每分钟约0.3°C~约0.1°C的速度。

[0314] 第二速度只要是比第一速度快、从第一速度变化为第二速度时开始冷冻这样的温度即可,可以适当设定,例如可以为每分钟约0.5~约5°C的速度,优选为每分钟约1~约3°C的速度。

[0315] 在一个实施方式中,角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞可用于细胞注入疗法。在一个实施方式中,制剂可在解冻后,在没有进一步的加工或培养的情况下给与。

[0316] (保存装置)

[0317] 在进一步的方式中,本公开可提供保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的装置,该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,该容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,该温度控制部能够进行指令以进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1°C的速度改变温度的阶段,根据需要,能够进行指令以将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0318] 在另外的方式中,本公开的装置的温度控制部可以进行指令以使在将温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时,以第一速度将温度降低至第一目标温度,然后以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度。所述装置可具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0319] 在进一步的方式中,本公开是编码安装在计算机中的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时包含至少一个以每分钟小于1°C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0320] 在另外的方式中,本公开的程序可以指令以使在将温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时,以第一速度将温度降低至第一目标温度,然后以第二速度将温度从第一目标温度降低至第二目标温度。所述程序可具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0321] 在进一步的方式中,本公开可提供记录介质,其存储有程序,该程序是编码安装在计算机中的方法以能够在装置中保存角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的程序,其中,该装置包含:容纳容器的容纳/保存部,所述容器容纳该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞;

温度控制部,其进行指令以控制在容纳/保存部中容纳的容器内的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的温度;和温度调节部,其能够基于该温度控制部的指令对该容纳/保存部中的温度进行温度调节,对于该温度控制部,该程序使其进行温度控制,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时至少包含一个以每分钟小于1°C的速度改变温度的阶段,根据需要,使该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持。

[0322] 在另外的方式中,存储在本公开的记录介质中的程序可以进行指令,以在使温度从非冷冻温度降低至冷冻目标温度时,以第一速度使温度降低至第一目标温度,然后以第二速度使温度从第一目标温度降低至第二目标温度。所述程序可具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0323] 通过本公开的装置或程序实现的各种功能的一部分或全部可以手动实现。

[0324] 利用本公开的装置或程序实现的各种功能的一部分或全部可以通过人工智能(AI)或机器学习来实现或最优化。

[0325] 本公开涉及的程序可以存储在计算机可读的记录介质中,另外也可以作为程序产品而构成。此处,该“记录介质”包含存储卡、USB存储器、SD卡、软盘、磁光盘、ROM、EPROM、EEPROM、CD-ROM、MO、DVD、以及Blu-ray(注册商标)Disc等任意的“可移动用物理介质”。

[0326] 另外,“程序”是指用任意的语言、记述方法记述的数据处理方法,而不论源代码、二进制代码等的形式。应予说明,“程序”并不一定限于单一地构成,也包含作为多个模块、程序库而分散构成的程序、与以OS(Operating System)为代表的另外的程序协作来实现其功能的程序。应予说明,对于在实施方式中所示的各装置中用于读取记录介质的具体构成、读取步骤、或者读取后的安装步骤等,可以使用公知的构成、步骤。

[0327] 各种数据库等是RAM、ROM等存储装置、硬盘等固定盘装置、软盘、光盘等存储手段,其存储各种处理、网站提供中使用的各种程序、表、数据库、网页用文件等。

[0328] 进而,装置的分散/合并的具体方式不限于图示,其全部或一部分可以根据各种附加等,或者根据功能负载以任意单元功能性或物理性地分散/合并而构成。即,可以将上述实施方式任意组合来实施,也可以选择性地实施实施方式。

[0329] (试剂盒)

[0330] 在进一步的方式中,本公开可提供冷冻制剂试剂盒,其包含容纳冷冻制剂的容器、和在维持冷冻状态的同时容纳该容器的容纳器,所述冷冻制剂在冷冻状态下包含ROCK抑制剂与角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0331] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂试剂盒,其包含容纳冷冻制剂的容器、和在维持冷冻状态的同时容纳该容器的容纳器,所述冷冻制剂在冷冻状态下包含角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞。

[0332] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂试剂盒,其包含本公开的制剂、容纳该制剂的容器和在冷冻状态下维持该制剂的同时容纳该容器的容纳器。

[0333] 在一个方式中,本公开可提供冷冻制剂试剂盒,其包含容器和容纳该容器的容纳器,其中,使用该容器以容纳本公开的制剂,使用该容纳器以在冷冻状态下维持该制剂。

[0334] 在一个方式中,本公开可提供试剂盒的使用,该试剂盒包含容器和容纳该容器的容纳器,其中使用该容器以容纳本公开的制剂,使用该容纳器以在冷冻状态下维持该制剂。

[0335] 在一个实施方式中,容纳器可将容纳的容器在约-80°C~约-20°C的范围内的温度

下维持。在一部分实施方式中,容纳器可将容纳的容器在约-80°C下维持。

[0336] (保存、运输及治疗)

[0337] 在进一步的方式中,本公开可提供本公开制剂的运输和/或保存方法,其中包含将该制剂配置于包含容器和容纳该容器的容纳器的试剂盒的容器中的工序,和将该试剂盒中的制剂在冷冻状态下维持的工序。

[0338] 在进一步的方式中,可提供进行角膜内皮细胞注入疗法的方法,其包含:提供适合于该细胞注入疗法的角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞的工序;冷冻工序,其包含至少一个将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞从非冷冻温度以每分钟小于1°C的速度降低温度的阶段;将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞在冷冻状态下维持,根据需要向该注入疗法运输的工序;将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞解冻的工序,以及将该角膜内皮细胞和/或角膜内皮样细胞给与受试体的工序。

[0339] 在另外的方式中,本公开的方法可包含:在使温度从非冷冻温度降低到冷冻目标温度时以第一速度使温度降低至第一目标温度,以及以第二速度使温度从第一目标温度降低至第二目标温度。所述方法可具有本公开中记载的一个或多个实施方式。

[0340] 在一个实施方式中,可以在约-80°C ~ 约-20°C的范围内的温度、优选在-80°C下维持的同时进行运输。

[0341] 向受试体的给与优选在解冻后6小时以内进行,例如可在6小时以内、5小时以内、4小时以内、3小时以内、2小时以内、1小时以内、30分钟以内、20分钟以内或10分钟以内进行。向受试体的给与可以在眼的前房内进行。

[0342] 以上,为了容易理解,示出了优选的实施方式来说明本公开。以下,基于实施例对本公开进行说明,但上述的说明和以下的实施例仅以例示的目的提供,并不是出于限定本公开的目的而提供。因此,本公开的范围不限于本说明书中具体记载的实施方式,也不限于实施例,而仅通过权利要求书限定。

[0343] 实施例

[0344] 以下,基于实施例更具体地说明本公开。可以理解的是,在本实施例中使用的各种试剂除了具体所示的试剂以外,还可以使用从Sigma-Aldrich、BASF日本株式会社等获得的试剂。

[0345] (实施例1:已知成分在冷冻保存液中的冷冻)

[0346] 甘油和聚乙二醇是作为细胞冷冻保存剂而广为人知的成分,但仅利用这些成分的保存效果低,因此通常进行白蛋白等蛋白质成分的添加、10% DMSO的添加。本实施例的目的在于,确认在这样的一般条件下是否可保存HCEC,进而确认在冷却速度比通常已知的-1°C/分钟慢时,即使在DMSO的浓度低的情况下是否也能够冷冻保存。

[0347] (材料)

[0348] • 4代传代后的人角膜内皮细胞

[0349] • OptiMEM™-I (Invitrogen 21585-070)

[0350] • Tryple™ Select酶 (10×) (Thermo Fisher Scientific A12177-01)

[0351] • 红十字白蛋白25%静注12.5g/50mL (日本血液制剂机构)

[0352] • 2.0ml Cryogenic Vials (Corning 430488)

[0353] • 程序冷冻仪 (NEPAGENE PF-NP-200)

- [0354] • Bicell(バイセル)(日本フリーザー株式会社)
- [0355] • iMatrix-511(nippi 892012)
- [0356] • Bambanker hRM(日本ジェネティクスCS-11-001)
- [0357] • 用10%DMSO预制的Cryostor CS10(Hemacare 210102)
- [0358] • 用5%DMSO预制的Cryostor CS5(Hemacare 205102)
- [0359] • 用2%DMSO预制的Cryostor CS2(Hemacare 202102)
- [0360] • CP-1优质(极东制药27207)
- [0361] • Bambanker无DMSO(日本ジェネティクスCS-09-001)
- [0362] • Cryo Scarless无DMSO(バイオベルデCPL-A1)
- [0363] • 12孔板(costar 3513)
- [0364] • PROTEOSAVE SS离心管50mL(住友ベークライトMS-52550)
- [0365] • STEMFULL(ステムフル)离心管15mL(住友ベークライトMS-90150)
- [0366] 使用含有4% HSA、和10%甘油或10%聚乙二醇、和10%、5%、2%或0%DMSO的OptiMEM作为保存液。
- [0367] (方法)
- [0368] 1. 使用了4代传代后的人角膜内皮细胞。从培养中的培养皿除去培养基,添加OptiMEM并洗涤。重复两次该操作。
- [0369] 2. OptiMEM除去后,添加Tryple™ Select酶(10×),在37°C(5%CO₂)下孵育20min。
- [0370] 3. 在20分钟后,在培养基中悬浮并回收到50ml STEMFULL中。
- [0371] 4. 以300G×5min的条件进行离心。
- [0372] 5. 除去上清液并用OptiMEM(2%HSA)悬浮。
- [0373] 6. 以300G×5min的条件进行离心。
- [0374] 7. 再次重复5-6。
- [0375] 8. 除去上清液,用OptiMEM(2%HSA)悬浮,并利用台盼蓝染色对细胞数计数。
- [0376] 9. 对于研究的冷冻保存试剂,相应地按照各 1.2×10^6 个分注至15ml STEMFULL中。另外,作为未冷冻组(Control),在12孔板中以1000个细胞/mm²的细胞密度接种,每隔2天交换培养基的同时培养2周。
- [0377] 10. 将15ml STEMFULL以300G×5min的条件进行离心。
- [0378] 11. 将回收的细胞用冷冻保存液保存在冻存管(CryoTube)中。
- [0379] 12. 用程序冷冻仪以-0.5°C/min从4°C至-80°C,进行冷冻。
- [0380] 13. 下降到-80°C后,移动到事先在-80°C冷却了的BiCell处理容器中,在-80°C的冷冻仪内冷冻保存3天。
- [0381] 14. 冷冻保存3天后,将保存有细胞的冻存管在37°C的水浴中溶化1-2分钟。
- [0382] 15. 在预先加热到37°C的培养基中回收细胞,通过台盼蓝染色计测回收细胞数和细胞存活率。
- [0383] 将实施例1的概要示于图1。
- [0384] (结果)
- [0385] 图2表示本实施例中使用的细胞的培养形态的照片。确认为没有形态异常的批次。
- [0386] 图3表示在改变了以4%人血清白蛋白和10%甘油为基础成分时的DMSO浓度的冷

冻保存液中保存,将融化后的细胞的存活率进行了比较的图表。在含有5%以上的DMSO时,可与冷却速度无关地维持高存活率,但在2%或0%时,冷却速度对细胞的存活率有很大影响,在-0.5°C/分钟时可维持90%以上的存活率。BiCell是容纳被冷冻的细胞的管的容器,其是在放入-80°C的冷藏器中时内部的温度以-1°C/分钟左右的速度降低的容器。用BiCell保存时,存活率比用程序冷冻仪以-1°C/分钟保存时低。

[0387] 图4表示在改变了以4%人血清白蛋白和10%聚乙二醇为基础成分时的DMSO浓度的冷冻保存液中保存,将融化后的细胞的存活率进行了比较的图表。与含有甘油的冷冻保存液的结果不同,即使在含有5%DMSO的冷冻保存液中,冷却速度的影响也表现在细胞存活率上。在2%DMSO以下的组成中,以-0.5°C/分钟的冷却速度冷冻时显示约80%的存活率,比以-1°C/分钟的冷却速度冷冻时高得多。这些结果表明通过减慢冷却速度而改善存活率。

[0388] (实施例2:冷冻保存剂和冷冻速度的研究)

[0389] (材料)

[0390] • 4代传代后的人角膜内皮细胞

[0391] • OptiMEM™-I (Invitrogen 21585-070)

[0392] • Tryple™ Select酶 (10×) (Thermo Fisher Scientific A12177-01)

[0393] • 红十字白蛋白25%静注12.5g/50mL (日本血液制剂机构)

[0394] • 2.0ml Cryogenic Vials (Corning 430488)

[0395] • 程序冷冻仪 (NEPAGENE PF-NP-200)

[0396] • Bicell (バイセル) (日本フリーザー株式会社)

[0397] • iMatrix-511 (nippi 892012)

[0398] • Bambanker hRM (日本ジェネテックスCS-11-001)

[0399] • 用10%DMSO预制的Cryostor CS10 (Hemacare 210102)

[0400] • 用5%DMSO预制的Cryostor CS5 (Hemacare 205102)

[0401] • 用2%DMSO预制的Cryostor CS2 (Hemacare 202102)

[0402] • CP-1优质 (极东制药27207) (含有10%DMSO) • Bambanker无DMSO (日本ジェネテックスCS-09-001)

[0403] • Cryo Scarless无DMSO (バイオベルデCPL-A1)

[0404] • 12孔板 (costar 3513)

[0405] • PROTEOSAVE SS离心管50mL (住友ベークライトMS-52550)

[0406] • STEMFULL离心管15mL (住友ベークライトMS-90150)

[0407] (方法)

[0408] 1. 使用了4代传代后的人角膜内皮细胞。从培养中的培养皿除去培养基,添加OptiMEM并洗涤。重复两次该操作。

[0409] 2. OptiMEM除去后,添加Tryple™ Select酶 (10×),在37°C (5%CO₂) 下孵育20min。

[0410] 3. 在20分钟后,在培养基中悬浮并回收到50ml STEMFULL中。

[0411] 4. 以300G×5min的条件进行离心。

[0412] 5. 除去上清液并用OptiMEM (2%HSA) 悬浮。

[0413] 6. 以300G×5min的条件进行离心。

[0414] 7. 再次重复5-6。

- [0415] 8. 除去上清液,用OptiMEM(2%HSA)悬浮,并利用台盼蓝染色对细胞数计数。
- [0416] 9. 对于研究的冷冻保存试剂,相应地按照各 1.2×10^6 个分注至15ml STEMFULL中。另外,作为未冷冻组(Control),在12孔板中以1000个细胞/ mm^2 的细胞密度接种,每隔2天交换培养基的同时培养2周。
- [0417] 10. 将15ml STEMFULL以300G \times 5min的条件进行离心。
- [0418] 11. 在各种冷冻保存试剂350 μ l中悬浮。
- [0419] 12. 将在各种冷冻保存试剂中以终浓度成为100 μ M的方式调整的Y-27632(100 μ l)添加到11的15ml STEMFULL中,调成总量450 μ l。
- [0420] 13. 在冻存管中各分注450 μ l(1.2×10^6 个/450 μ l)。
- [0421] 14. 在程序冷冻仪中以-1 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 或-0.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 或-0.2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 从4 $^\circ\text{C}$ 冷冻至-80 $^\circ\text{C}$ 。
- [0422] 15. 降低到-80 $^\circ\text{C}$ 后,移动至事先在-80 $^\circ\text{C}$ 冷却了的BiCell处理容器中,在-80 $^\circ\text{C}$ 冷冻仪内冷冻保存3天。
- [0423] 16. 冷冻保存3天后,将保存有细胞的冻存管在37 $^\circ\text{C}$ 的水浴中溶化1~2分钟。
- [0424] 17. 在事先加热到37 $^\circ\text{C}$ 的培养基中回收细胞,通过台盼蓝染色计测回收细胞数和细胞存活率。
- [0425] 18. 将回收的细胞在12孔板中以1000个细胞/ mm^2 的细胞密度再接种。
- [0426] 19. 每隔2天交换培养基,同时培养2周。
- [0427] 20. 在培养第7天,用相位差显微镜(200倍)以5个视野拍摄细胞照片,计算细胞密度。
- [0428] (结果)
- [0429] 图5表示将从4 $^\circ\text{C}$ 以-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 、-0.5 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 或-0.2 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻的细胞融化后的存活率进行比较的数据。在含有DMSO的冷冻保存剂中,在-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 、-0.5 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 和-0.2 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的任一条件下都实现了高的存活率。在不含DMSO的冷冻保存剂中,细胞存活率以与冷却速度成反比的形式提高,因此,减慢冷却速度显示具有提高细胞存活率的效果。另外,若将以-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻了的细胞融化,并接种到培养器中,则发现很多不粘附在底面的细胞,暗示角膜内皮细胞的功能降低。由此暗示了以比-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 慢的冷却速度冷冻在改善角膜内皮细胞的存活率和维持功能方面是重要的。
- [0430] 图6表示从4 $^\circ\text{C}$ 以-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 或-0.5 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻并保存,将保存后接种第7天的细胞密度进行比较的数据。在含有2%DMSO的CS2、不含有DMSO的Bambanker无DMSO、Cryo Scarless无DMSO中以-1 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 冷冻时,细胞密度低,但在以-0.5 $^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻时,显示出高的细胞密度。由此表明:冷却速度也对保存后的培养中的细胞密度造成影响。
- [0431] (实施例3:添加DMSO的培养研究)
- [0432] (方法)
- [0433] 1. 用与实施例2(1-10)相同的方法回收细胞,使用Cryostor CS2将细胞保存在冻存管(CryoTube)中。
- [0434] 2. 用程序冷冻仪以-0.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 从4 $^\circ\text{C}$ 冷冻至-80 $^\circ\text{C}$ 。
- [0435] 3. 降低到-80 $^\circ\text{C}$ 后,移动至事先在-80 $^\circ\text{C}$ 冷却了的BiCell处理容器中,在-80 $^\circ\text{C}$ 冷冻仪内冷冻保存3天。

- [0436] 4. 冷冻保存3天后,将保存有细胞的冻存管在37°C的水浴中溶化1-2分钟。
- [0437] 5. 在事先加热到37°C的培养基中回收细胞,通过台盼蓝染色计测回收细胞数和细胞存活率。
- [0438] 6. 将回收的细胞分注到4根15ml STEMFULL中,以300G×5min的条件进行离心。
- [0439] 7. 离心后,除去上清液,使用包含DMSO10%、5%、2%、0%的培养基调节至1000个细胞/mm²的细胞密度,再接种至12孔板。
- [0440] 8. 在接种后1h、3h、6h、24h通过相位差显微镜拍摄细胞的照片。
- [0441] 9. 在各时间拍摄细胞照片后,回收也包含漂浮的细胞的容器中的所有细胞,并通过台盼蓝染色测定细胞存活率。
- [0442] 将实施例3的概要示于图7。
- [0443] (结果)
- [0444] 图8示出了在添加有10%或5%的DMSO的培养基中培养的细胞的相位差显微镜图像。在添加了10%或5%的DMSO的培养基中培养的细胞与在不添加DMSO的培养基中培养的细胞相比,细胞数显著降低,表明在培养器的底部(已涂有层粘连蛋白)非粘附的细胞多。在不含DMSO的培养基中培养的细胞即使在接种后1小时,大部分的细胞也粘附,3小时时所有细胞粘附,相对于此,对于DMSO 10%,直至24小时完全没有发现细胞的粘附。即使对于DMSO 5%,在1小时后也几乎没有发现粘附细胞,3小时后、6小时后发现半数以下的细胞的粘附,但是24小时后反而几乎没有粘附细胞。在图8的显微镜图像中,看起来白的细胞表示非粘附细胞,看起来黑的非圆形细胞表示粘附细胞。
- [0445] 图9示出了在包含2%的DMSO或不含有DMSO的培养基中培养的细胞的相位差显微镜图像。在包含2%的DMSO的培养基中培养的细胞的粘附率与在不含DMSO的培养基中培养的细胞的粘附率相比没有变化。
- [0446] 在眼的前房内的环境中,前房液逐渐置换,但是在以含有DMSO的组成注入细胞的情况下,认为暴露于相当时间高浓度的DMSO中,因此可以预想以含有10%等高浓度的DMSO的冷冻保存剂的状态将细胞注入前房内时会对角膜内皮细胞的存活率、粘附带来很大的障碍。
- [0447] 图10是表示回收再接种后的细胞并调查存活率的结果的图表。在显微镜照片(图8)中,几乎没有粘附的在包含10%DMSO的培养基中培养的细胞的存活率在1小时的时刻也没有降低。然而,由于之后存活率降低,从而推定虽然在含有10%DMSO的培养基中培养的细胞在1小时的时刻没有发现存活率的降低,但是已经受到严重的损害,因此不能粘附。
- [0448] 根据这些结果,注入前房内的细胞制剂中含有的DMSO优选为5%以下,最优选为2%以下或不含有。
- [0449] (实施例4:冷冻融化后的稳定性的研究)
- [0450] (方法)
- [0451] 1. 用与实施例2(1-10)相同的方法回收细胞,使用Cryostor CS10、CS5、CS2,在冻存管中每种保存液各保存6根。
- [0452] 2. 用程序冷冻仪以-0.5°C/min从4°C冷冻至-80°C。
- [0453] 3. 下降到-80°C后,移动至事先在-80°C冷却的BICELL处理容器中,在-80°C冷冻仪内冷冻保存3天。

[0454] 4. 冷冻保存3天后,将保存细胞的冻存管在37°C的水浴中溶化1~2分钟。

[0455] 5. 对于每种保存液各1根,立即在预先加温到37°C的培养基中回收细胞,通过台盼蓝染色测定细胞存活率(0h)。各自剩余的5根在室温下放置30min,1h,3h,6h,24h后,用同样的方法回收细胞,通过台盼蓝染色测定细胞存活率。

[0456] 6. 在各个时间回收的细胞以1000个细胞/mm²的细胞密度在12孔板中再接种。

[0457] 7. 分别从再接种的时间起培养24h后,通过相位差显微镜拍摄细胞照片。

[0458] 将实施例4的概要示于图11。

[0459] (结果)

[0460] 图12示出了在室温下将在含有10%DMSO的Cryostor CS10中冷冻了的细胞放置0小时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。在室温下放置6小时以上时,观察到细胞增殖、粘附能力的降低。

[0461] 图13示出了在室温下将在含有5%DMSO的Cryostor CS5中冷冻了的细胞放置0小时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。在室温下放置了6小时的细胞中,虽然确认有少许的细胞增殖及粘附能力的降低,但与CS5相比其程度较低。

[0462] 图14示出了在室温下将在含有2%DMSO的Cryostor CS2中冷冻了的细胞放置0小时、30分钟、1小时、3小时、6小时或24小时后,再接种到T25培养烧瓶中,24小时后拍摄细胞的培养状态的相位差显微镜图像。即使对于在室温下放置了6小时的细胞也没有发现变化。

[0463] 图15是表示回收再接种后的细胞并调查存活率的结果的图表。从这些结果可以认为,在包含5%以下、优选2%以下的DMSO的冷冻保存剂中冷冻了的细胞制剂在融化后也是稳定的制剂,在临床使用上的便利性大。

[0464] (实施例5:VIXELL™中的冷冻保存和保存后的角膜内皮细胞的注入)

[0465] 通过填充干冰,VIXELL™可将-75°C±15°C维持18天。在本实施例中,使用VIXELL™将角膜内皮细胞进行保存、运输,然后进行角膜内皮细胞的注入。

[0466] (方法)

[0467] (冷冻保存)

[0468] 1. 回收培养的角膜内皮细胞,在添加有100μM的Y27632的CryoStor(注册商标)CS2中以 1.2×10^6 个细胞/450μl的细胞密度悬浮。

[0469] 2. 使用程序冷冻仪将小瓶从4°C以-0.5°C/分钟的速度使温度降低至-80°C并冷冻。

[0470] 3. 将保存的小瓶放入BICELL™中,在-80°C暂时保存于冷藏器中。

[0471] 4. 取出保存的小瓶,将其放入含有干冰的VIXELL™中保存5天。

[0472] (细胞注入)

[0473] 对于剥离了直径为8mm的角膜内皮细胞的模型,将用Cryostor CS2冷冻保存的培养人角膜内皮细胞在用于运输医疗品的冷藏箱(VIXELL™)中保存5天后,不灌流前房水而注入,由此观察生物体内的角膜内皮再生的动态。

[0474] 【表1】

	组织确认	①内皮剥离	②灌流	③细胞注入
[0475]	(1R-3R: n=3) 注入1天后	直径8mm 角膜内皮剥离	×	Cryostor CS2 +HCEC8.0 × 10 ⁵ 个 +Y-27632
	(4R-6R: n=3) 注入5天后	直径8mm 角膜内皮剥离	×	Cryostor CS2 +HCEC8.0 × 10 ⁵ 个 +Y-27632

[0476] 在3小时的俯卧姿势结束后,经过1、2、3、5天时,通过裂隙灯显微镜进行前眼部观察,确认有无炎症、感染。在手术的前一天、当天、术后2、4天,将5mg/mLのプログラフ注射液加入100mL生理盐水而稀释,将总量6ml注射到耳后静脉。术后1、5天安乐死,进行免疫染色。

[0477] (结果)

[0478] 图16表示将在冷藏箱中保存了5天的细胞融化时的存活率和细胞回收率。存活率以5天时的活细胞数/总细胞数计算。细胞回收率是将理论上的细胞数(填充的细胞数)设为100%时的回收率。

[0479] 为了确认在冷藏箱中保存的细胞是否保持正常的性状,将融化后的细胞利用离心分离而除去冷冻保存剂,在再悬浮于通常的含有8%FBS的OPTI-MEM培养基(也包含Y27632)中后,接种到T25培养烧瓶中培养2天。图17示出了在冷藏箱中保存后培养2天的细胞的显微镜照片。以与非冷冻细胞相同的形状粘附在培养器的底面上,由此确认保持了正常的性状。

[0480] 图18示出了注入了在冷藏箱中保存后的细胞的兔眼的照片。通过植入角膜内皮细胞,维持了角膜的透明性。

[0481] 图19示出了细胞注入后第1天的角膜内皮的CD166的免疫组织染色的照片。固定角膜内皮的组织,使针对作为角膜内皮细胞的表达标记之一的CD166的抗体作为1次抗体结合后,结合荧光标记的2次抗体,进行免疫组织染色。确认了注入的细胞干净地植入为单层,CD166强烈表达。上段表示角膜中央部,下段表示周边部。由于用仅与人的CD166结合的抗体进行染色,因此兔子的角膜内皮未被染色,确认了明确的边界。

[0482] 图20示出了细胞注入后第1天的ZO-1和Na/K ATPase的免疫组织染色的照片。ZO-1和Na/K ATPase作为角膜内皮细胞的功能分子表达。图21示出了细胞注入后第5天的角膜内皮的CD166、ZO-1和Na/K ATPase的免疫组织染色的照片。

[0483] 这些结果表明注入的角膜内皮细胞植入于角膜内皮并正常发挥功能。

[0484] (实施例6: -0.7°C/分钟的冷却速度下的冷冻)

[0485] 本实施例的目的在于确认在与实施例1同样的已知成分的冷冻保存液和与实施例2同样的市售保存液中,从4°C以-0.7°C/分钟的冷却速度冷冻时的角膜内皮细胞的存活率。

[0486] 图22和图24表示本实施例的概要。

[0487] (结果)

[0488] 图23示出了在改变了以4%人血清白蛋白和10%甘油为基础成分时的DMSO浓度的冷冻保存液中以-1°C/分钟、-0.7°C/分钟、-0.5°C/分钟、或-0.2°C的冷却速度进行冷冻,将融化后的细胞的存活率进行比较的图表。在包含10%DMSO的冷冻保存液中,以-0.5°C/分钟和-0.2°C的冷却速度进行冷冻的情况下,确认有存活率的改善倾向。另外,在包含5%DMSO的冷冻保存液中,以-0.7°C/分钟、-0.5°C/分钟、以及-0.2°C的冷却速度进行冷冻的情况下,确认有存活率的改善倾向。在包含2%DMSO的冷冻保存液和不含有DMSO的冷冻保存液

中,以 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 、 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 、以及 -0.2°C 的冷却速度进行冷冻的情况下,确认有显著的存活率的改善。

[0489] 图25示出了在市售的冷冻保存液中,从 4°C 以 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率和回收率。存活率以活细胞数/总细胞数来计算。细胞回收率设为将理论上的细胞数(填充的细胞数)设为100%时的回收率。图26示出了将在市售的冷冻保存液中,从 4°C 以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率进行比较的数据。图27示出了将在市售的冷冻保存液中,从 4°C 以 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻了的细胞在融化后的存活率进行比较的数据。在不含DMSO的冷冻保存液中,以 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 、 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 及 $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻时,与以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的冷却速度冷冻时相比,确认有存活率的显著改善。

[0490] 根据实施例1和2的结果和本实施例的结果,通过以 $-0.7^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 和比其更慢的冷却速度冷冻并保存,细胞存活率得到改善。特别地,在包含2%这样低的DMSO的冷冻保存液和不含有DMSO的冷冻保存液中,发现有显著的存活率的改善,因此通过本公开的方法,能够减少冷冻保存时的DMSO。

[0491] (实施例7:小玻璃瓶制剂的冷冻保存)

[0492] 在本实施例中,进行在小玻璃瓶中的冷冻保存。如以下所示,与容器无关,通过以缓慢的冷却速度冷冻,能够以高的存活率保存。

[0493] (材料及方法)

[0494] 用与实施例2(1-10)相同的方法回收细胞,并用以下的保存溶液和冷却速度将细胞保存在小玻璃瓶中。

[0495] • 对照组:保存溶液:CS2+Y-27632($100\mu\text{M}$)、冷冻速度: $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -80^{\circ}\text{C}$)

[0496] • HSA添加组:保存溶液:CS2+Y-27632($100\mu\text{M}$)+4% HSA,冷冻速度: $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -80^{\circ}\text{C}$)

[0497] • 速度(1)组:保存溶液:CS2+Y-27632($100\mu\text{M}$),冷冻速度: $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -10^{\circ}\text{C}$)、保持110min(-10°C)、 $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -80^{\circ}\text{C}$)

[0498] • 速度(2)组:保存溶液:CS2+Y-27632($100\mu\text{M}$),冷冻速度: $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -10^{\circ}\text{C}$)、 $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($\sim -80^{\circ}\text{C}$)

[0499] (结果)

[0500] 图29~31表示温度的推移。样品的急剧温度上升是由于冷却时观察到的潜热而导致的。以 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷却至 -80°C 并冷冻时,显示出以超过85%的高的存活率保存。另外,添加HSA,在相同的冷却条件下保存时,存活率进一步上升,显示出超过90%的存活率。另外,以缓慢的速度冷却至 -10°C (之后也可以在 -10°C 维持一定时间)、之后以 $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却并保存的情况也同样地与对照组相比,存活率上升,显示出超过90%的存活率(图28)。在所有的保存组中,未发现细胞形状的异常。

[0501] 这样,无论容器如何,通过以缓慢的冷却速度冷冻并保存,都显示能够以高的存活率保存细胞。另外,通过以缓慢的速度冷却至特定的温度(之后也可以将温度维持一定时间)、然后加快速度进行冷却并保存,显示进一步改善了细胞存活率。

[0502] 如以上所述,使用本发明的优选的实施方式对本公开进行了例示,但是可以理解:本公开仅应通过权利要求书来解释其范围。可以理解:在本说明书中引用的专利、专利申请

和文献应当与其内容本身在本说明书中具体记载同样地,其内容作为对于本说明书的参考引用。本申请请求2021年11月11日申请的日本专利申请第2021-184246号的优先权利益,其内容通过参考而并入本说明书中。

[0503] 产业上的可利用性

[0504] 提供了在降低了DMSO浓度或不含DMSO的冷冻保存液中的角膜内皮细胞的冷冻方法以及能够直接给与患者的细胞冷冻制剂的制造方法。这样,由于制剂可用于细胞移植等,因此可在制药等的领域利用。

目的/方法

- 目的: 在已知成分的冷冻保存液中, 获取冷冻速度的数据
 - 使用细胞: YR69 (Lot223)
 - 保存浓度: 120×10^4 个细胞 /450 μ l
 - 保存条件: ① 在Bicell中于-80 $^{\circ}$ C保存3天
 ② 从23 $^{\circ}$ C以-1 $^{\circ}$ C/min \rightarrow -80 $^{\circ}$ C保存3天
 ③ 从23 $^{\circ}$ C以-0.5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow -80 $^{\circ}$ C保存3天
 - 保存液: OptiMEM + 4%HSA + 甘油10% 或者 聚乙二醇 10% + DMSO 10%、5%、2%、0%
-

图1

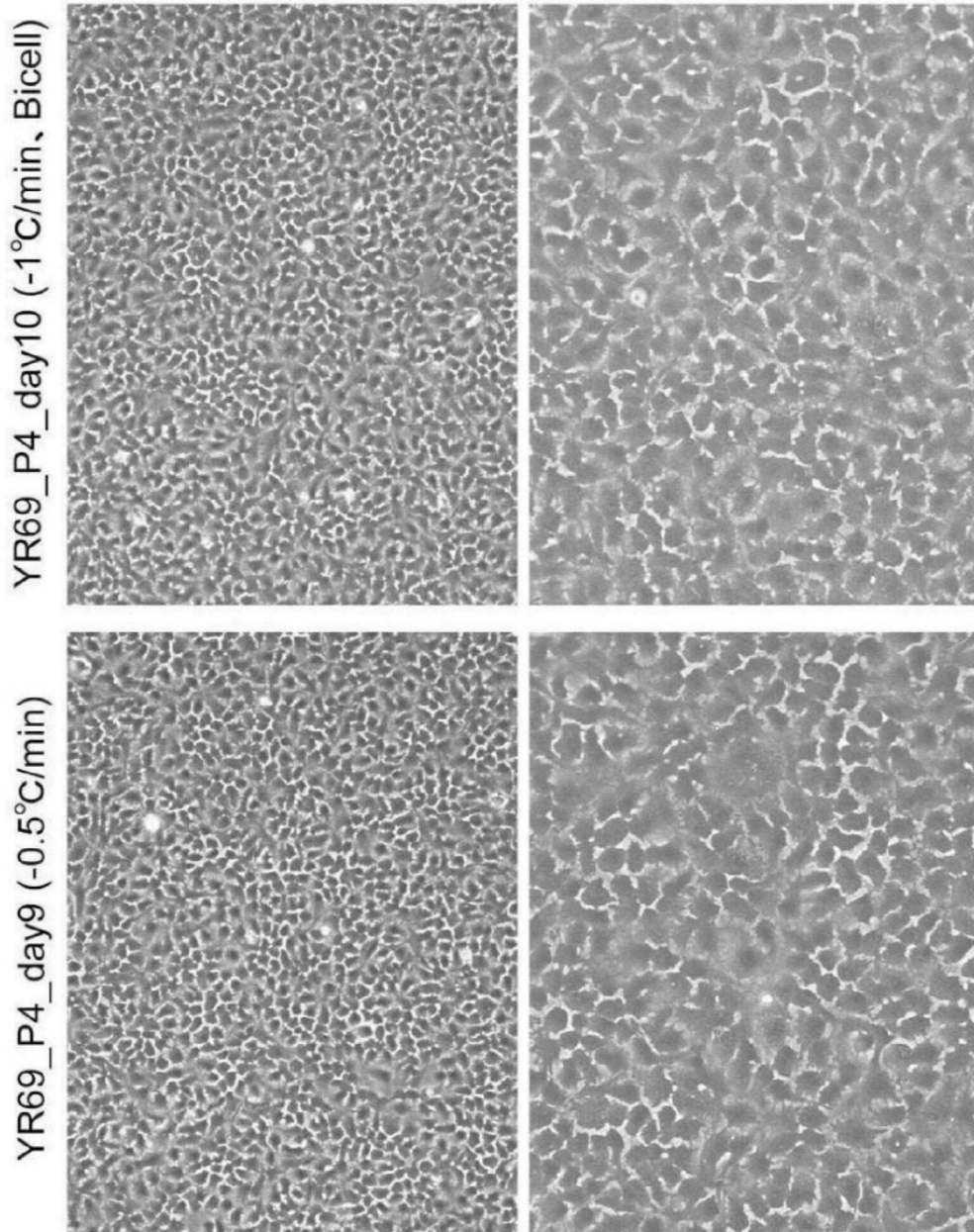


图2使用细胞

结果 复苏（起眼）时的活细胞率

保存液: OptiMEM + 4%HSA + 10% 甘油 + 10%,5%,2%,0%DMSO

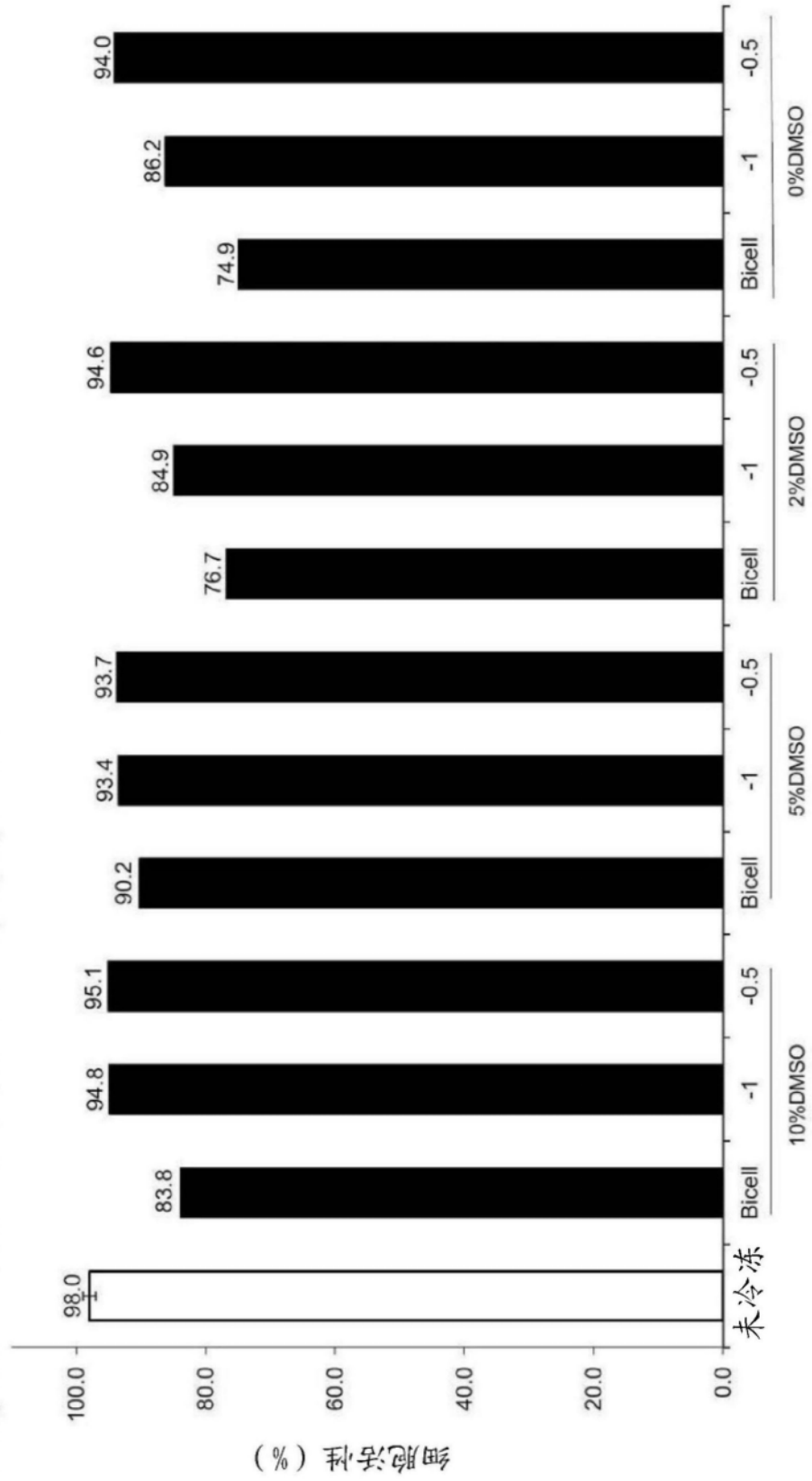


图3

结果 复苏时的活细胞率

保存液: OptiMEM + 4%HSA + 10% 聚乙二醇 + 10%,5%,2%,0%DMSO

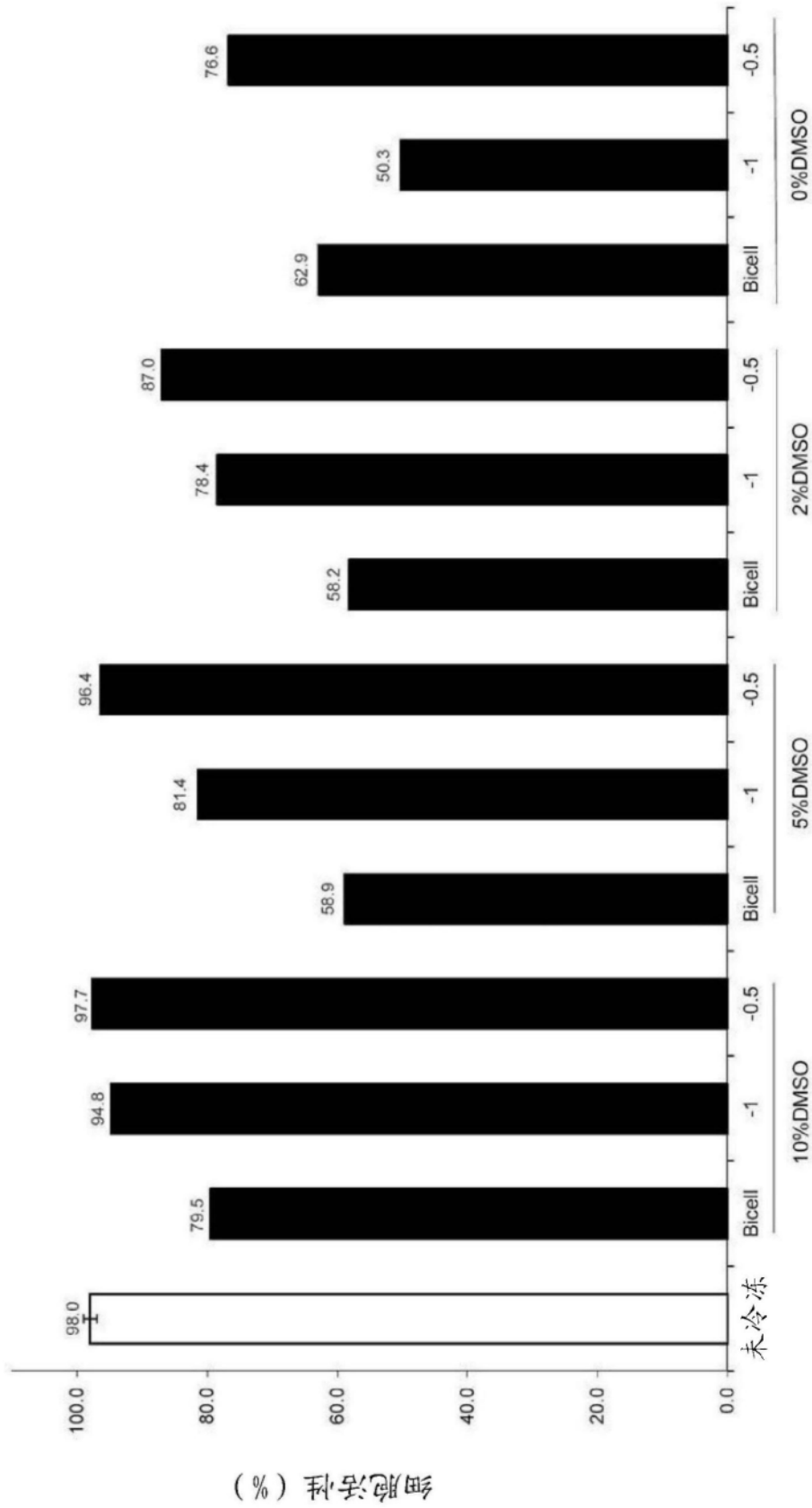


图4

复苏时的活细胞率 (23°C 起始)

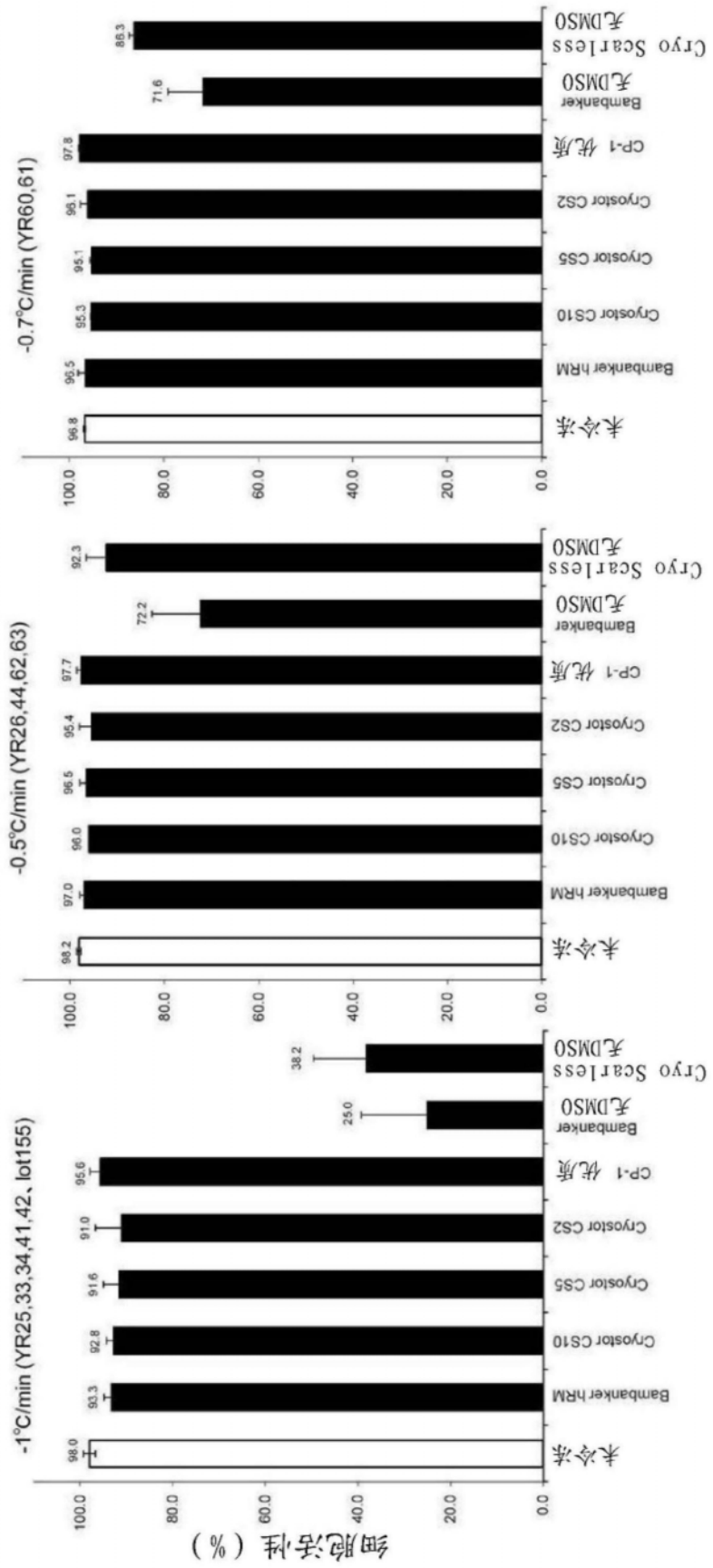


图5

保存后接种第7天的细胞密度 (从4°C开始降低温度)

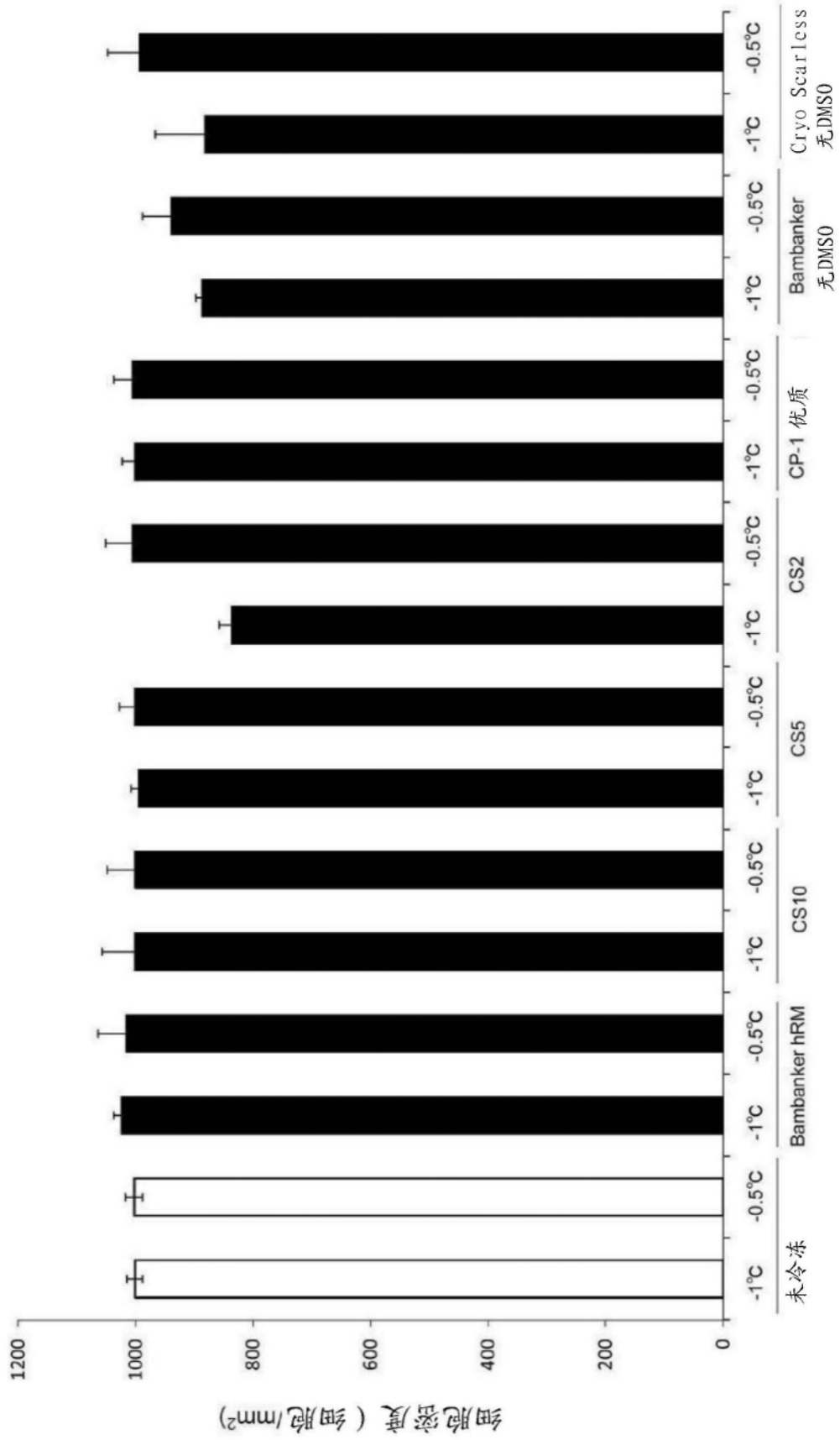


图6

目的/方法

- 目的：设想以包含DMSO的状态给与前房内，经时地评价DMSO的细胞毒性
- 使用细胞：YR27_P4_day21
- 保存浓度： 120×10^4 个细胞 /450 μ l
- 保存条件：以-0.5 $^{\circ}$ C/min冷冻 \rightarrow 移入Bicc11于-80 $^{\circ}$ C保存3天 \rightarrow 解冻后，在包含DMSO 10%，5%，2%，0%的培养基中接种
- 保存液：Cryosstor CS2

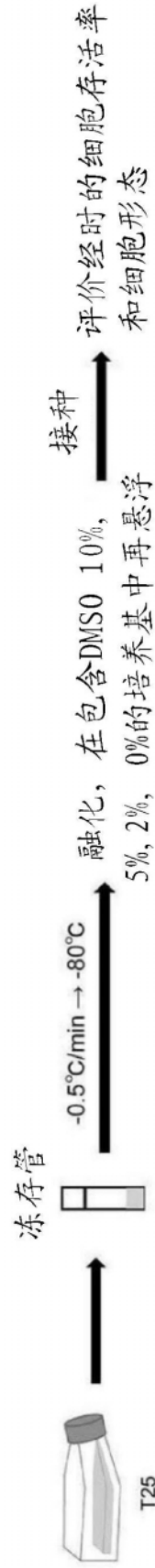


图7

结果 DMSO添加后的经时的细胞形态

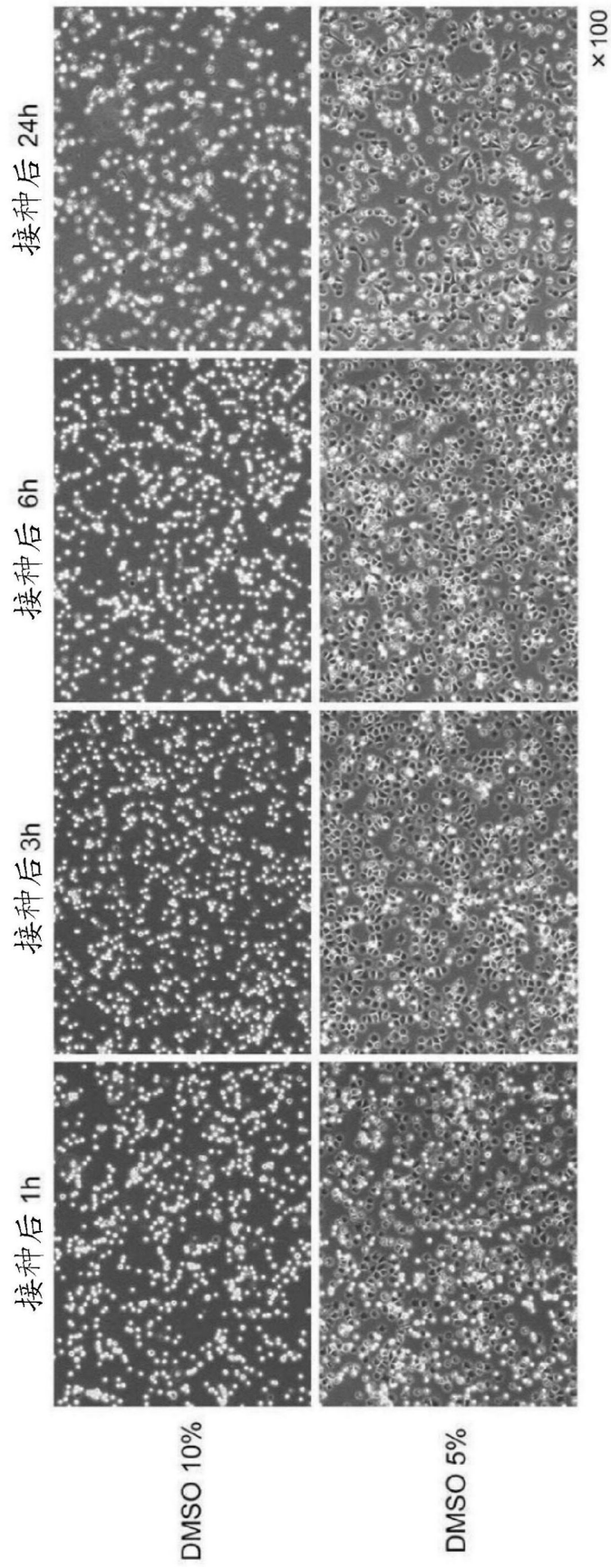


图8

结果 DMSO添加后的经时的细胞形态

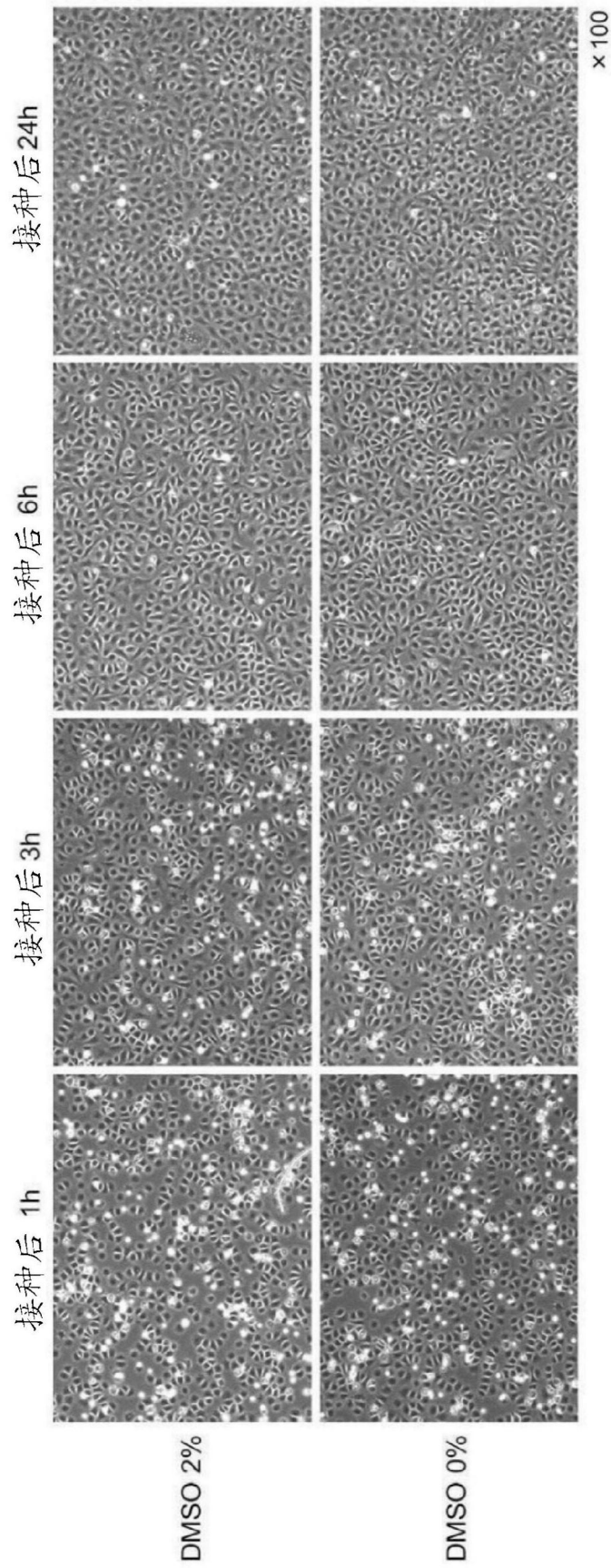


图9

结果 DMSO添加后的经时的细胞存活率

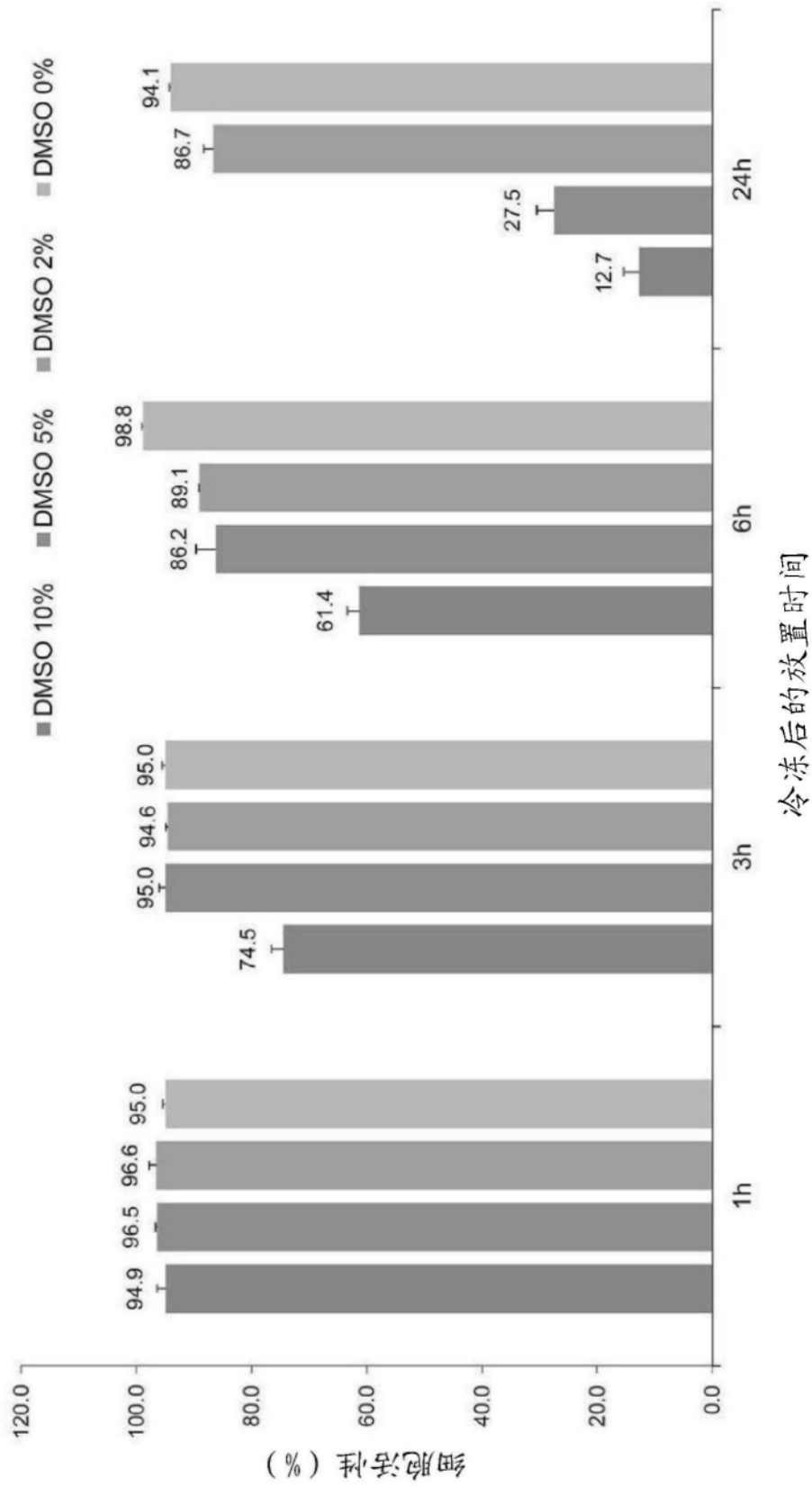


图10

目的/方法

- 目的：研究在冷冻融化后于室温放置时的稳定性
- 使用细胞：YR57_P4_day11
- 保存浓度： 120×10^4 个细胞/450 μ l
- 保存条件：以-0.5 $^{\circ}$ C/min冷冻→移入Biccl11于-80 $^{\circ}$ C保存3天→解冻后，在室温下放置0min, 30min, 1h, 3h, 6h, 24h
- 保存液：① Cryosstor DMSO 浓度为10%、5%、2%这3种
② Cryo Scarless 无DMSO

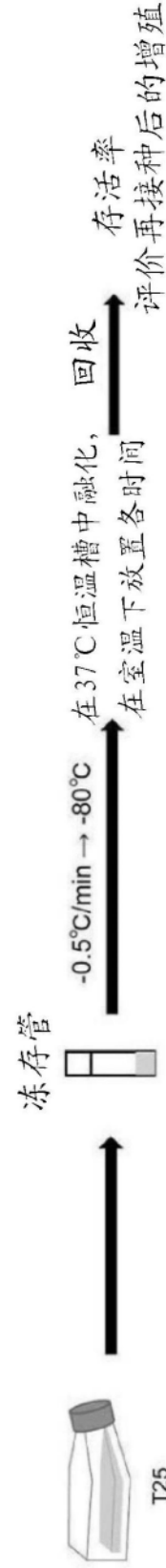


图11

结果 接种24h后 (CS10保存)

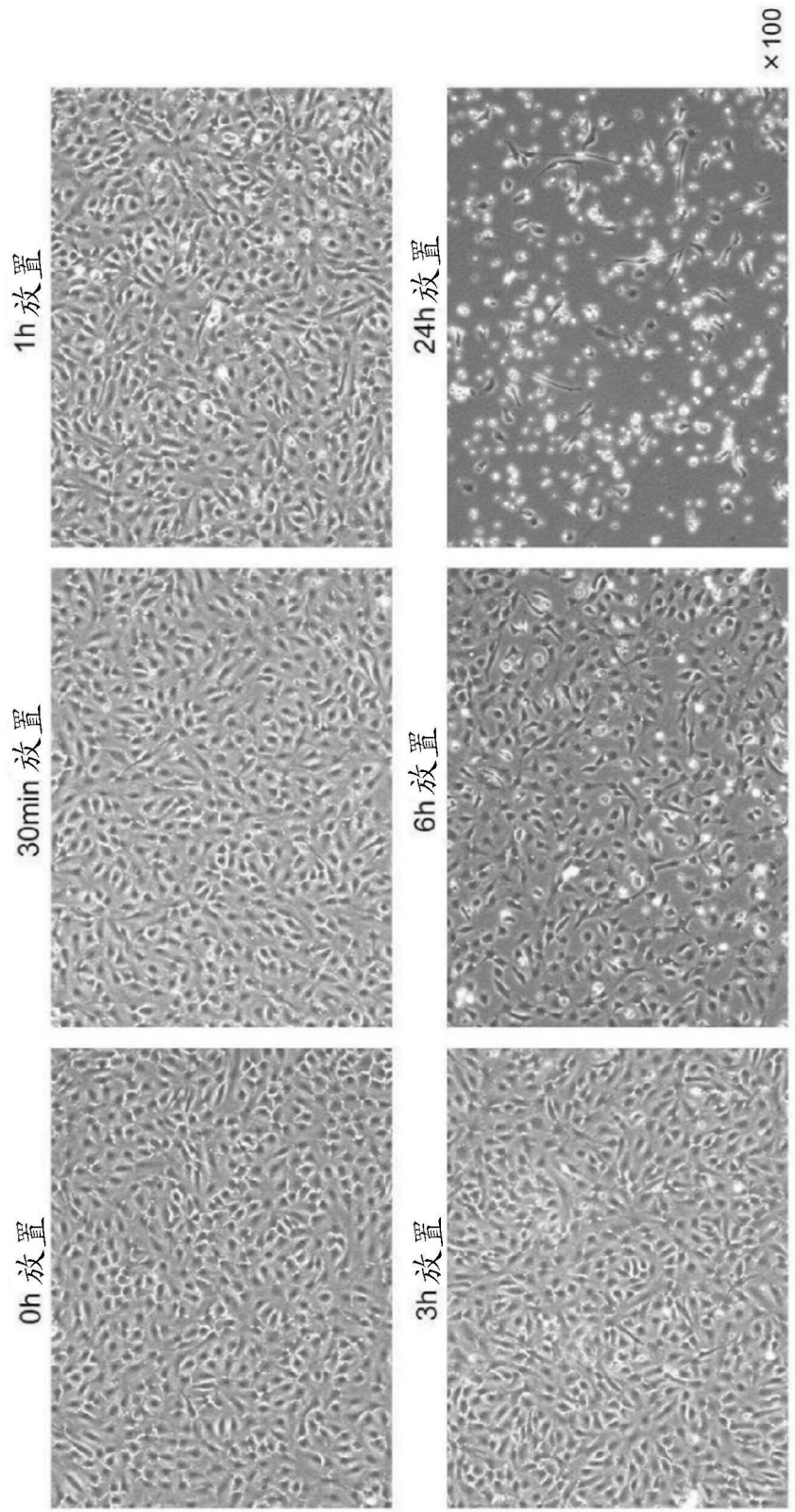


图12

结果 接种24h后 (CS5保存)

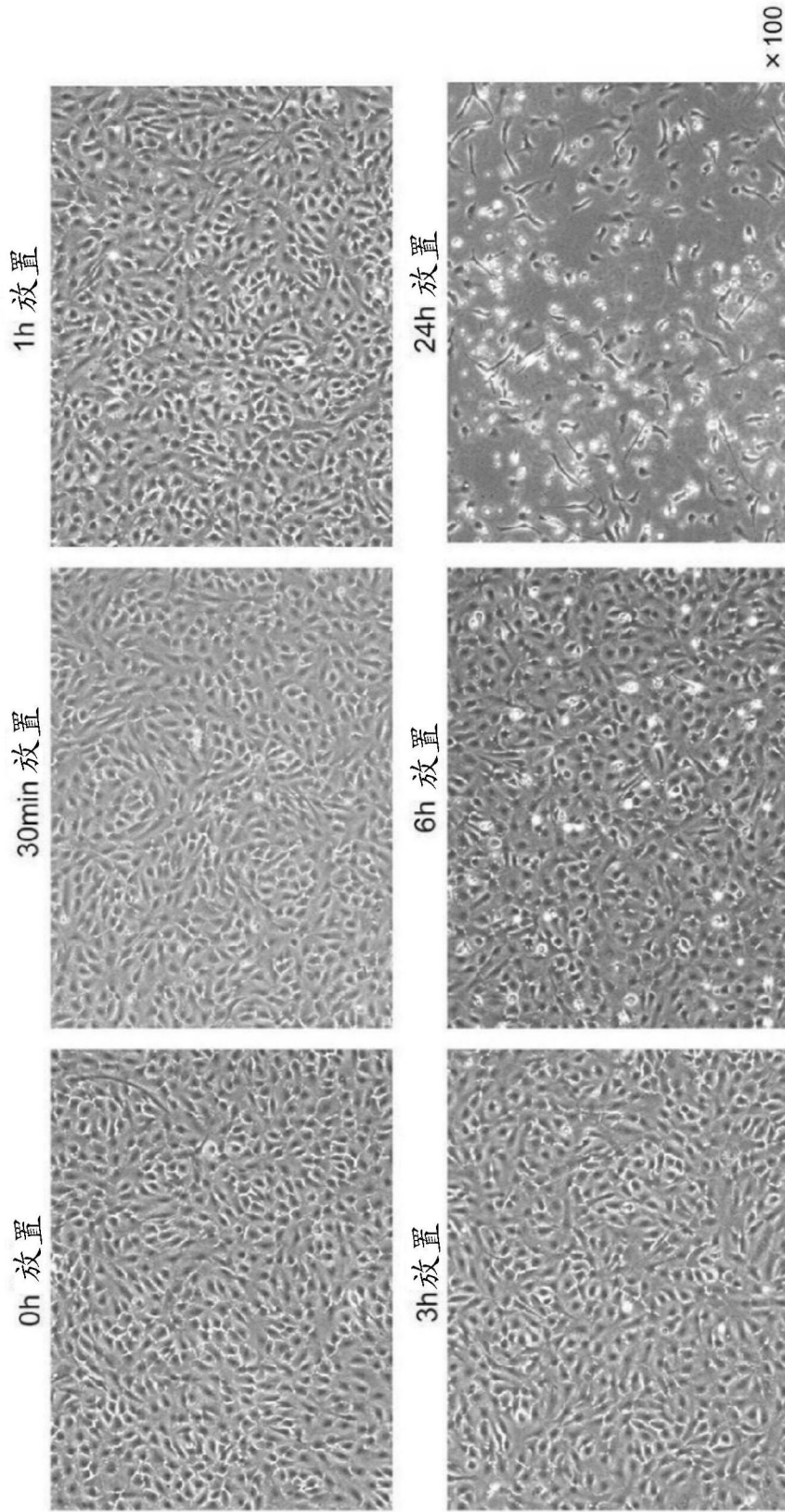


图13

结果 接种24h后 (CS2保存)

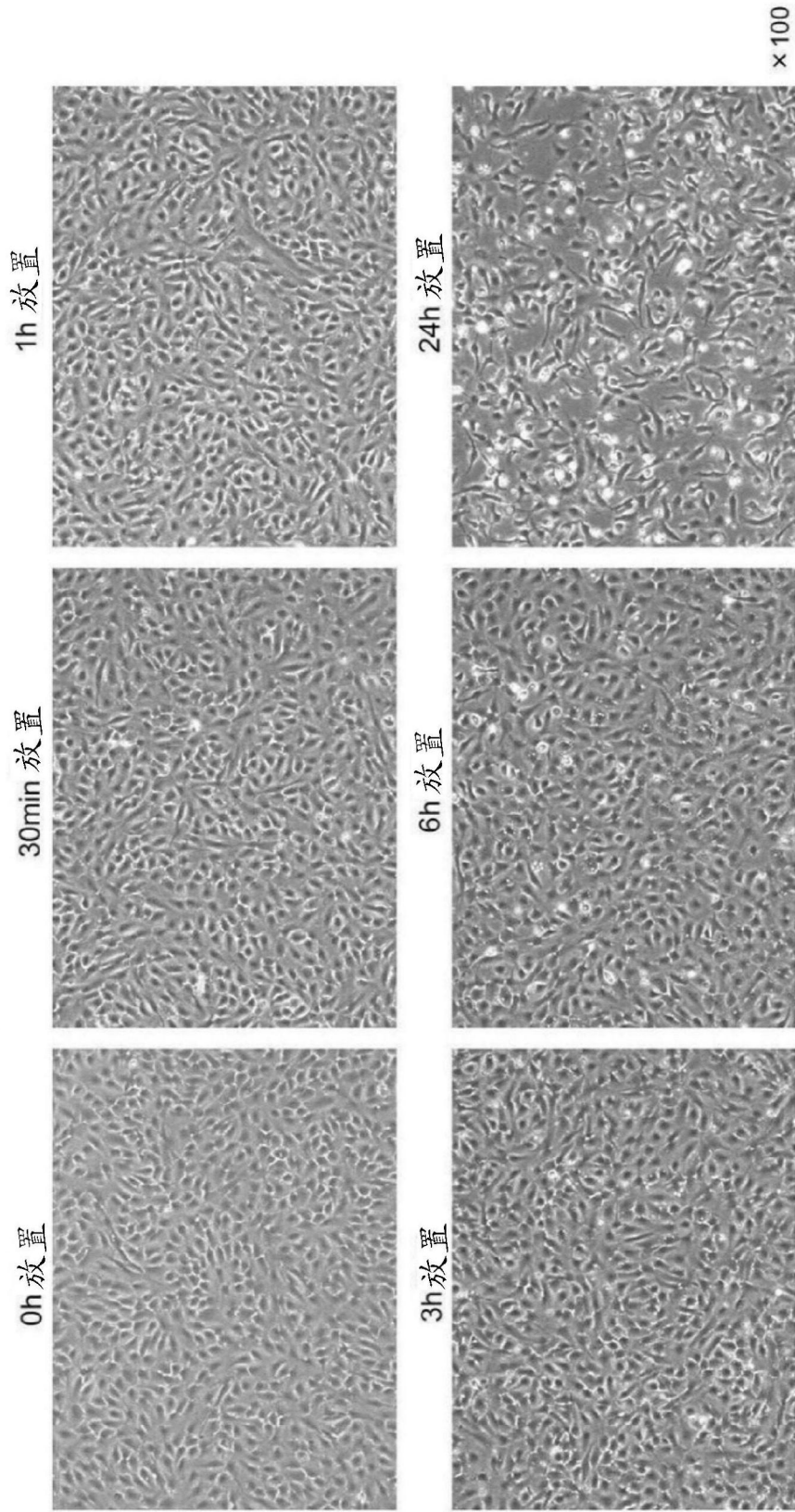


图14

结果 在融化后于室温放置后的细胞存活率

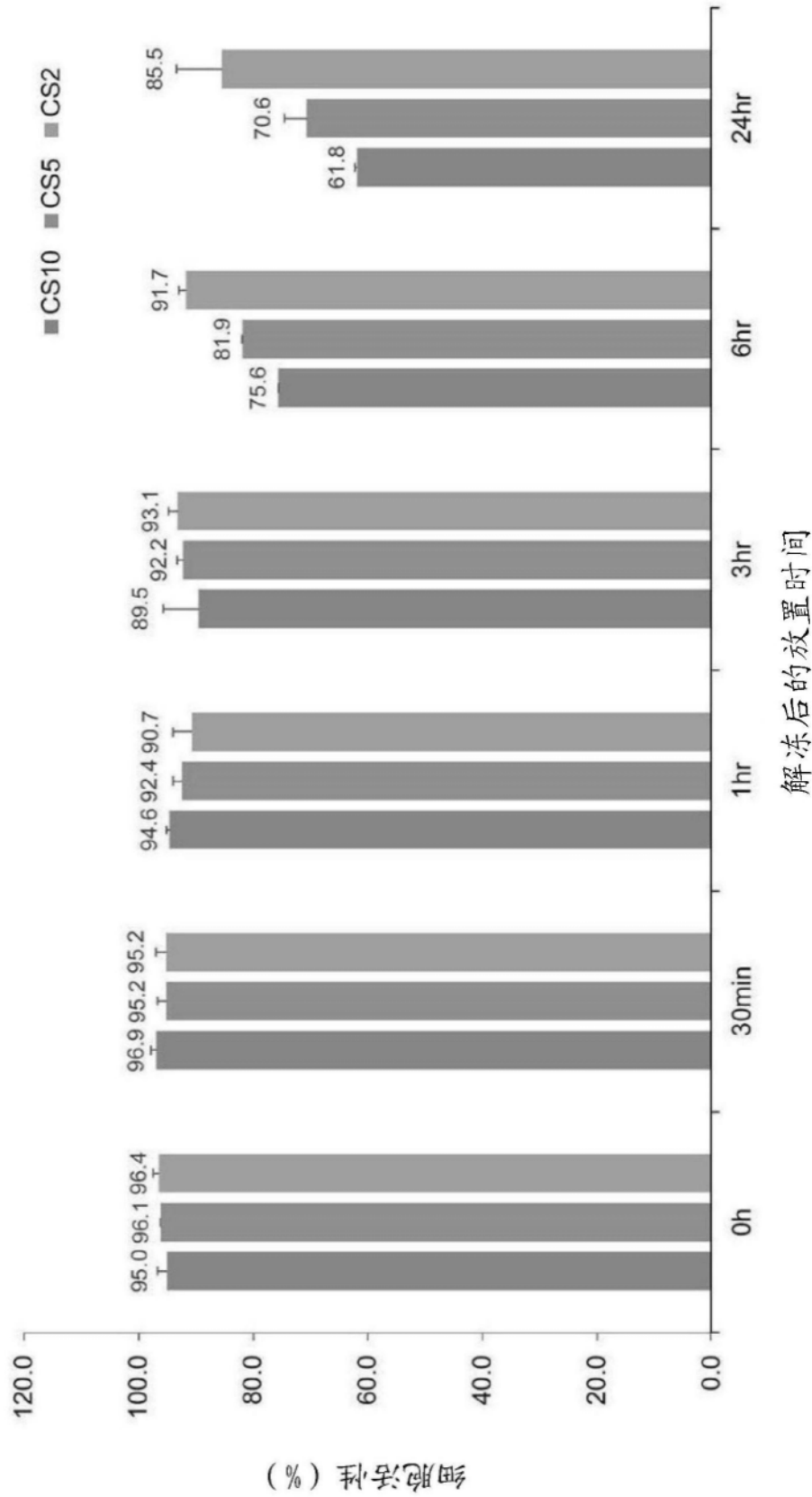


图15

在VIXELL™ 中储存五天后存活的HCECs

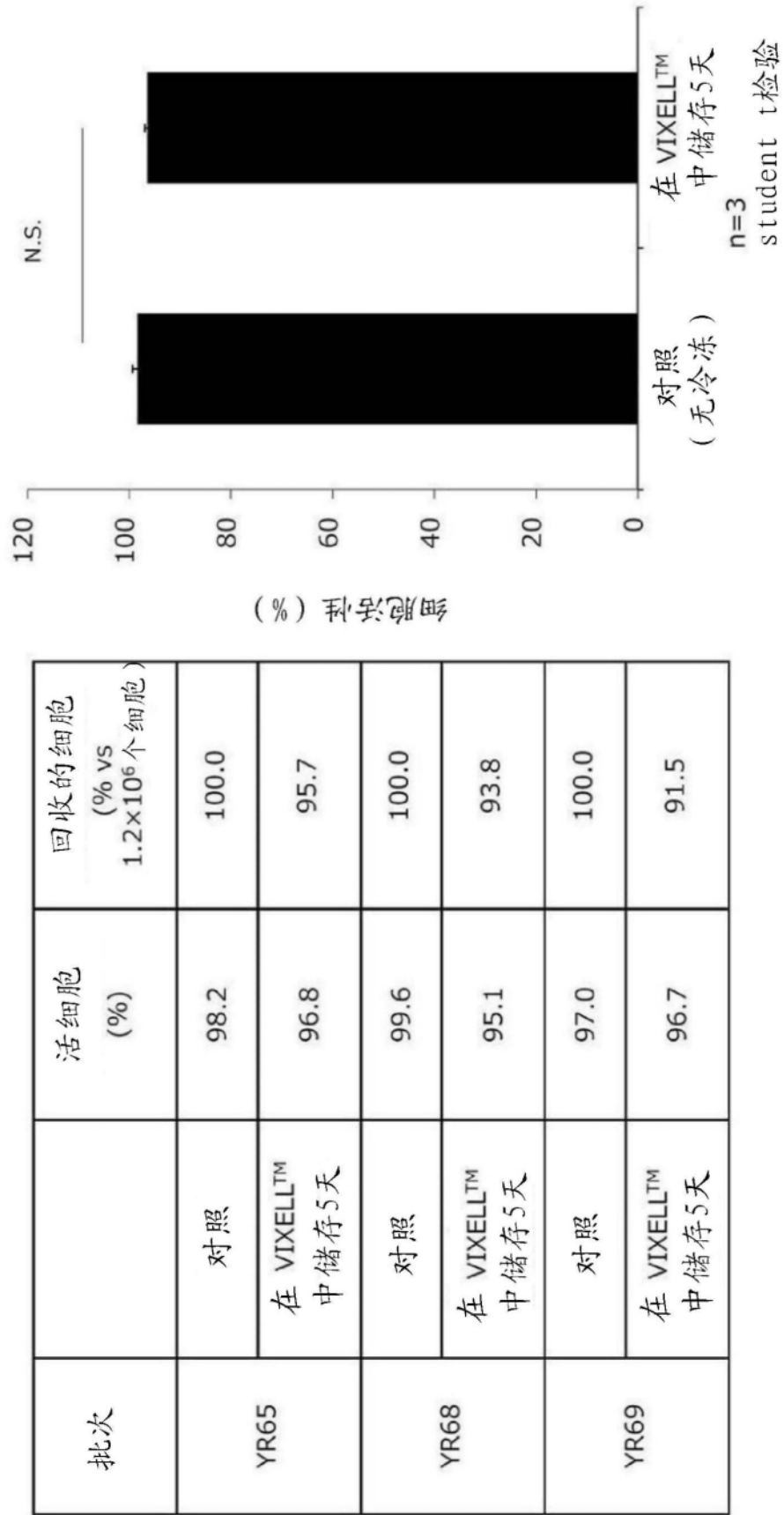


图16

在VIXELL™中储存5天后细胞形态没有改变

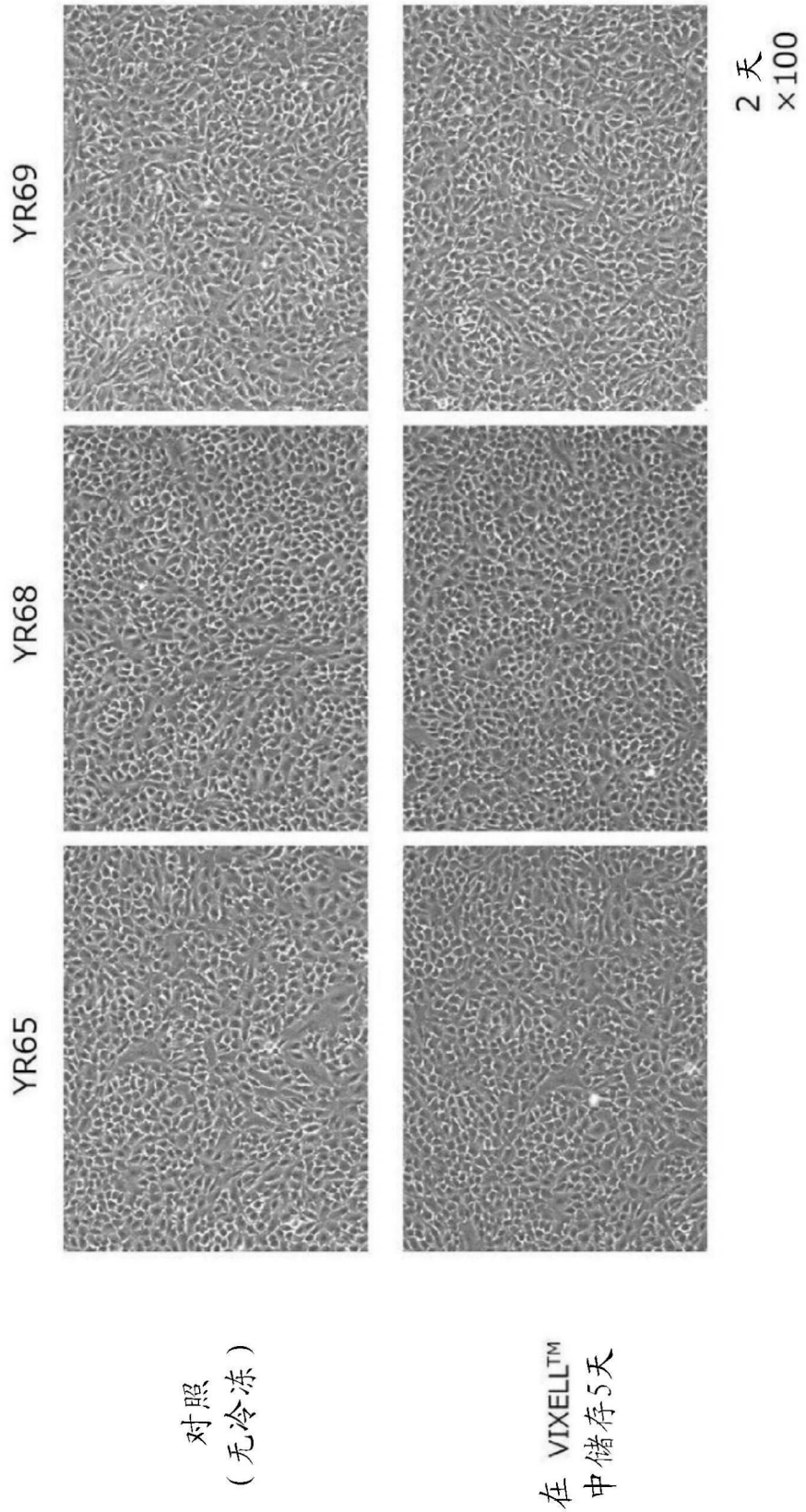


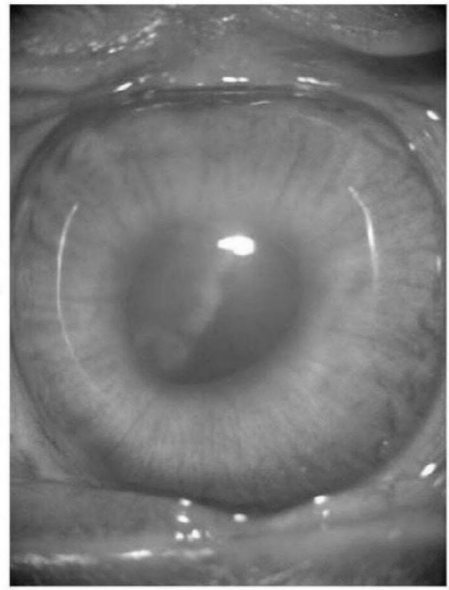
图17

裂隙灯显微镜显示透明度的恢复

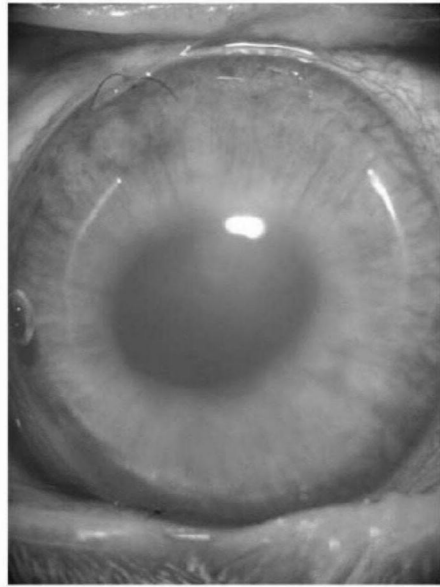
第2天



第5天



第1天



第3天

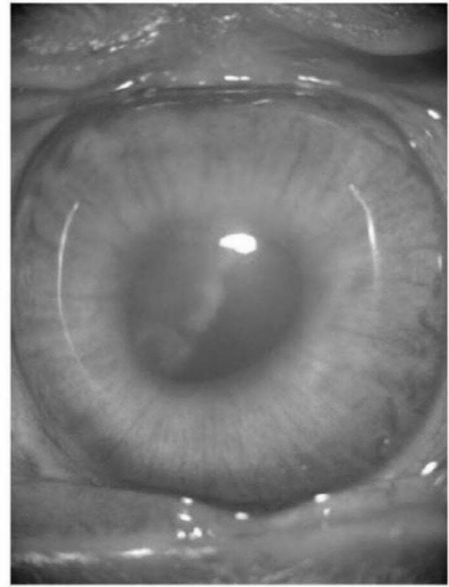


图18

通过注射在VIXELL™中储存后的冷冻细胞而恢复角膜内皮

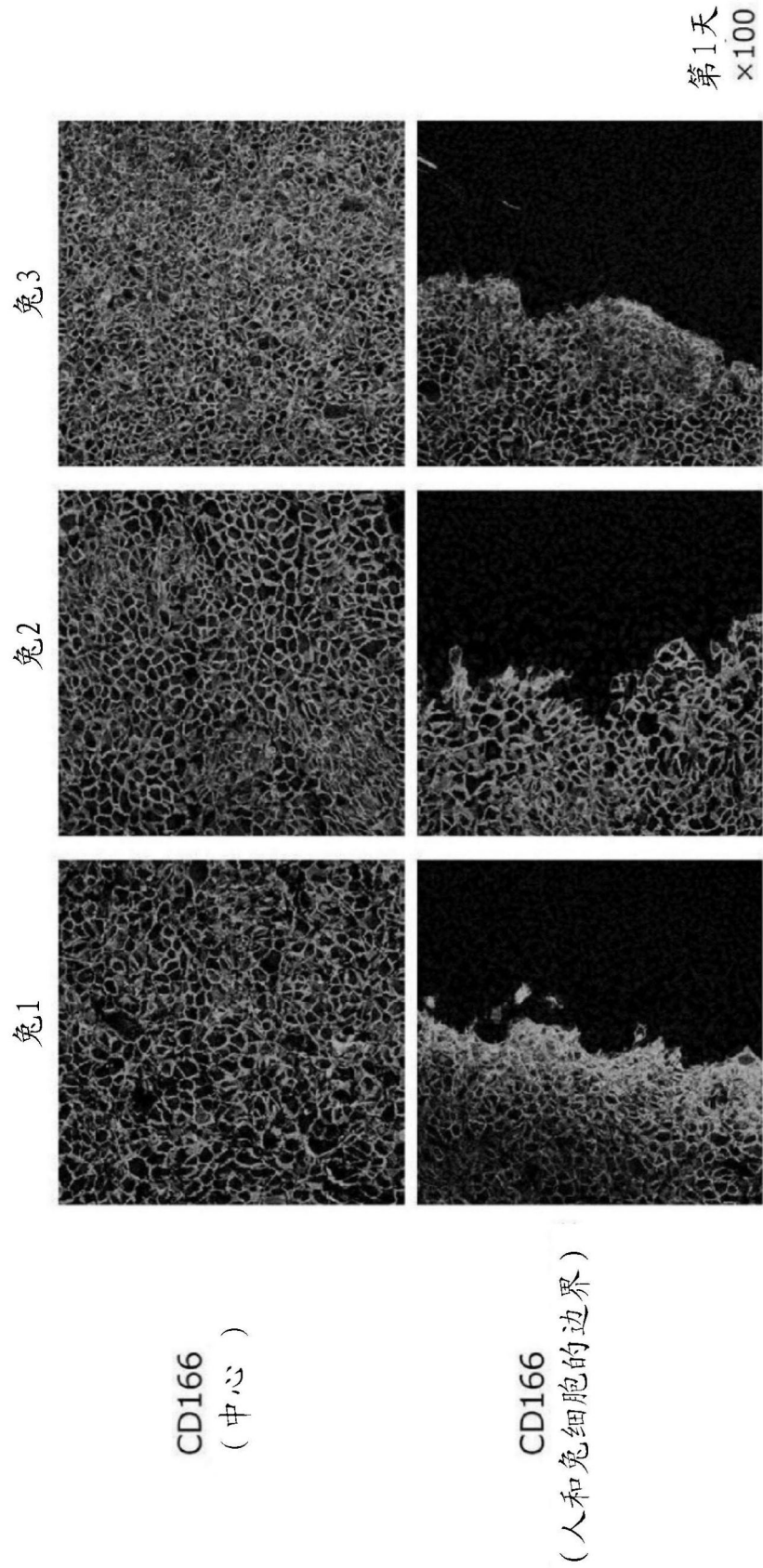
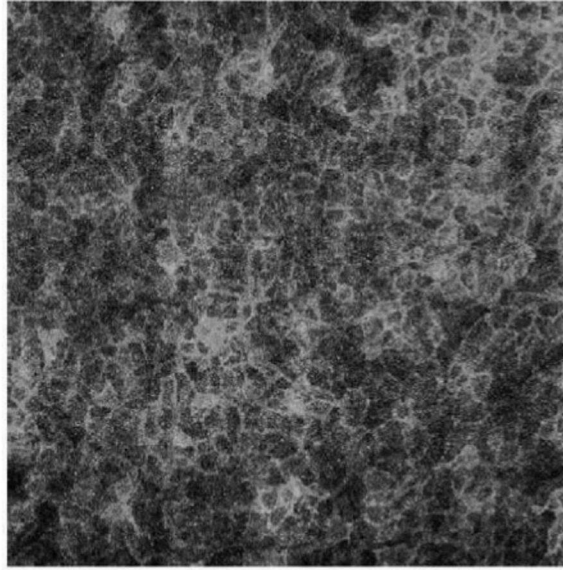
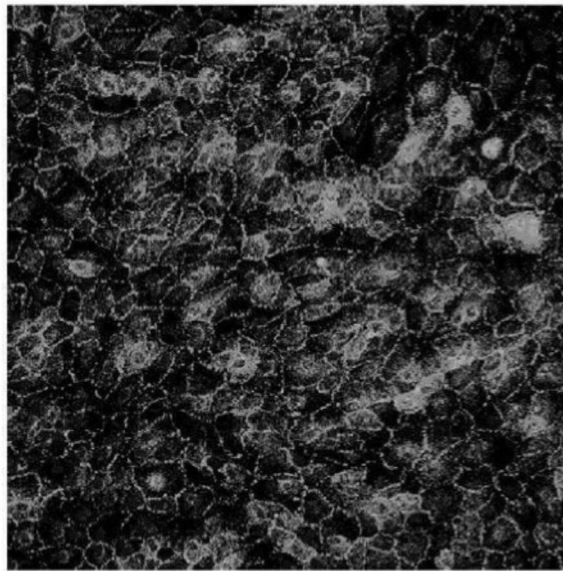


图19

通过注射在VIXELL™中储存后的冷冻细胞而恢复角膜内皮

ZO-1

Na⁺/K⁺-ATPase



第1天
×100

图20

通过注射在VIXELL™中储存后的冷冻细胞而恢复角膜内皮

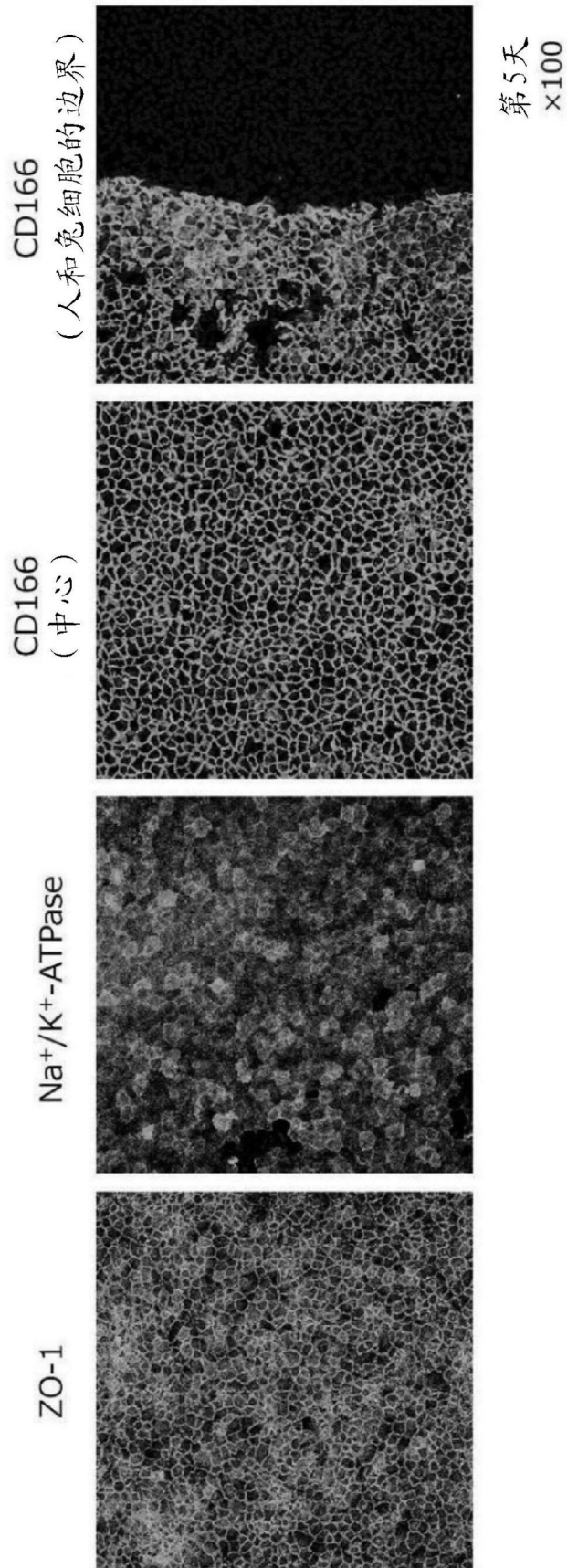
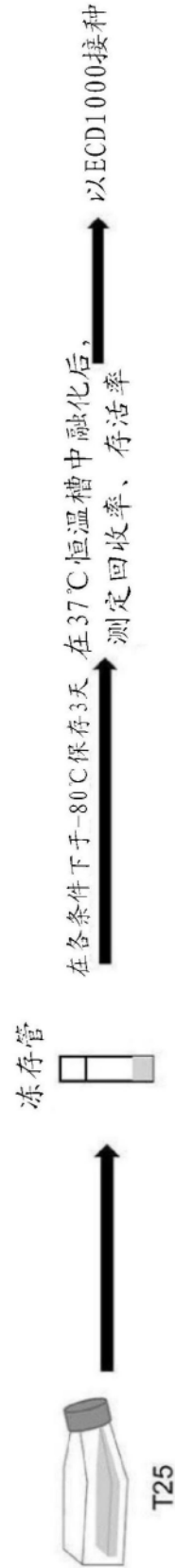


图21

目的/方法

- 目的：在已知成分的保存液中，获取冷冻速度的数据
- 使用细胞：YR71、73、74
- 保存浓度： 120×10^4 个细胞 /450 μ l
- 冷冻速度：-1 $^{\circ}$ C/min、-0.7 $^{\circ}$ C/min、-0.5 $^{\circ}$ C/min、-0.2 $^{\circ}$ C/min（4 $^{\circ}$ C开始）
- 保存液：OptiMEM + 4%HSA + 10% 甘油 + 10、5、2、0%DMSO

图22



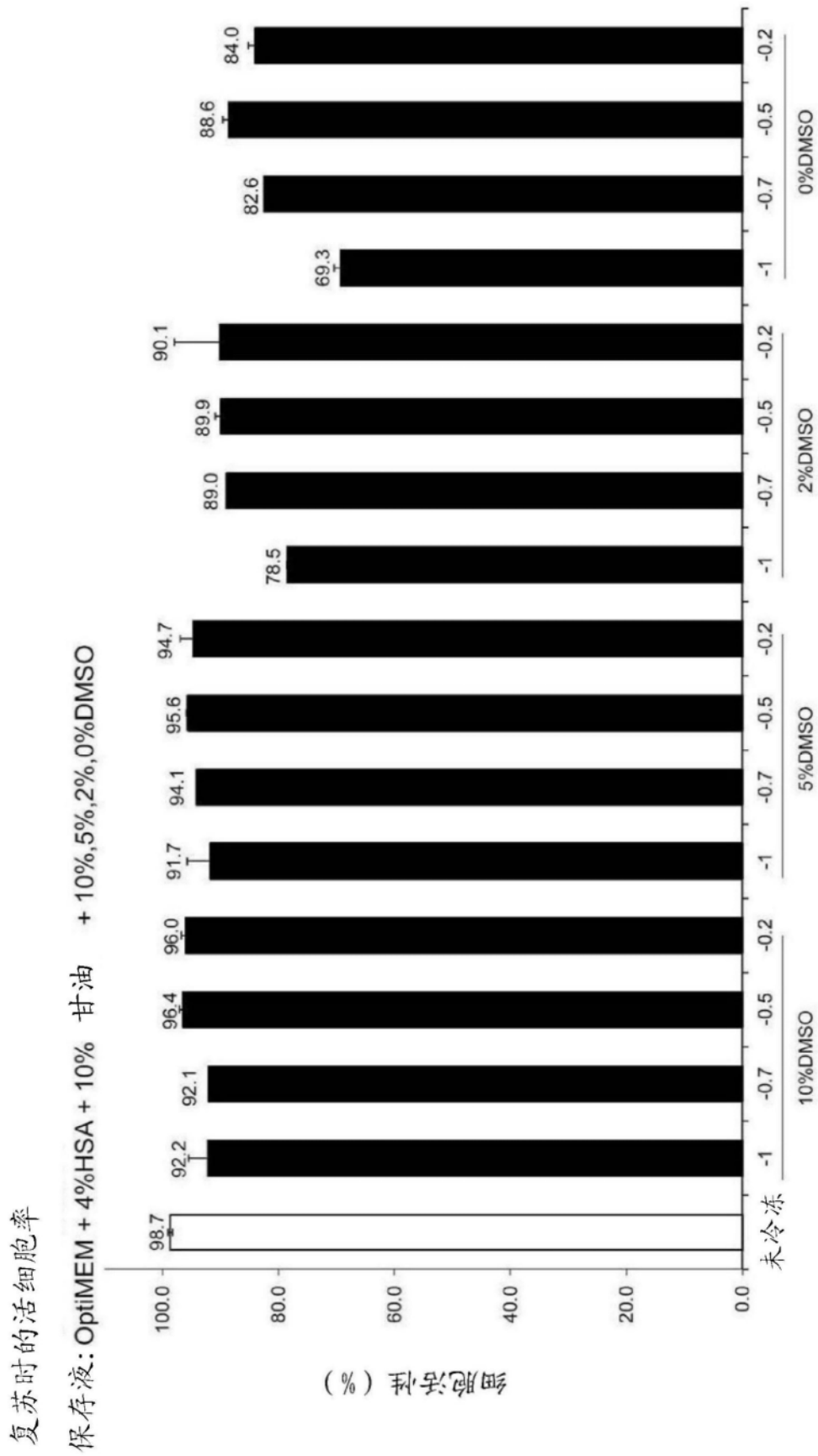


图23

目的/方法

- 目的：在市售的保存液中，取得以-0.5℃作为基准的冷冻速度的范围
- 使用细胞：YR73、74
- 保存浓度：120 × 10⁴ cells/450μl 个细胞
- 保存条件：-0.7℃/min (4℃开始)
- 保存液：① Bambanker hRM (DMSO 浓度 10%)
 ② Cryosstor DMSO 浓度为10%、5%、2%这3种
 ③ CP-1 优质 (DMSO 浓度 5%)
 ④ Bambanker 无DMSO
 ⑤ Cryo Scarless 无DMSO

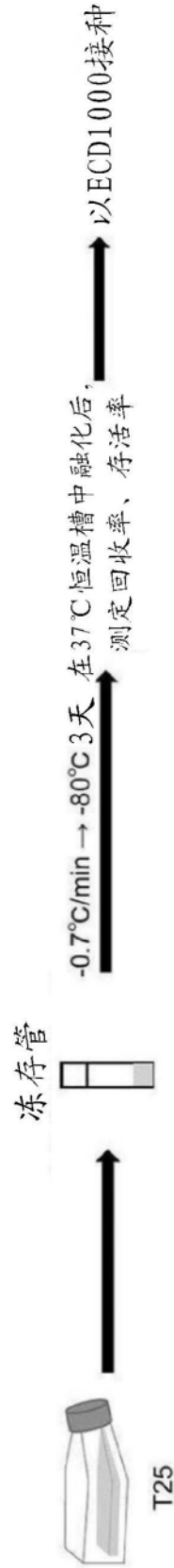


图24

结果 复苏时的活细胞率和回收率 (4°C开始 -0.7°C/min)

使用细胞	保存液	活细胞率	回收率 (% vs 120 × 10 ⁴ 个细胞)
YR73_P4_day9	未冷冻	99.4	100.0
	Bambanker hRM	97.1	95.0
	Cryosotr CS10	96.1	91.7
	Cryosotr CS5	97.9	95.4
	CP-1 优质	95.6	86.7
	Cryosotr CS2	97.7	92.5
	Bambanker 无DMSO	69.5	84.2
	Cryo Scarless 无DMSO	86.0	85.8
	未冷冻	99.4	100.0
	Bambanker hRM	96.8	85.0
YR74_P4_day10	Cryosotr CS10	98.0	91.7
	Cryosotr CS5	97.1	83.3
	CP-1 优质	95.5	90.0
	Cryosotr CS2	97.7	90.0
	Bambanker 无DMSO	66.7	98.3
	Cryo Scarless 无DMSO	91.5	91.7
	未冷冻	99.4	100.0
	Bambanker hRM	96.8	85.0

※120 × 10⁴ 个细胞 /450μl保存

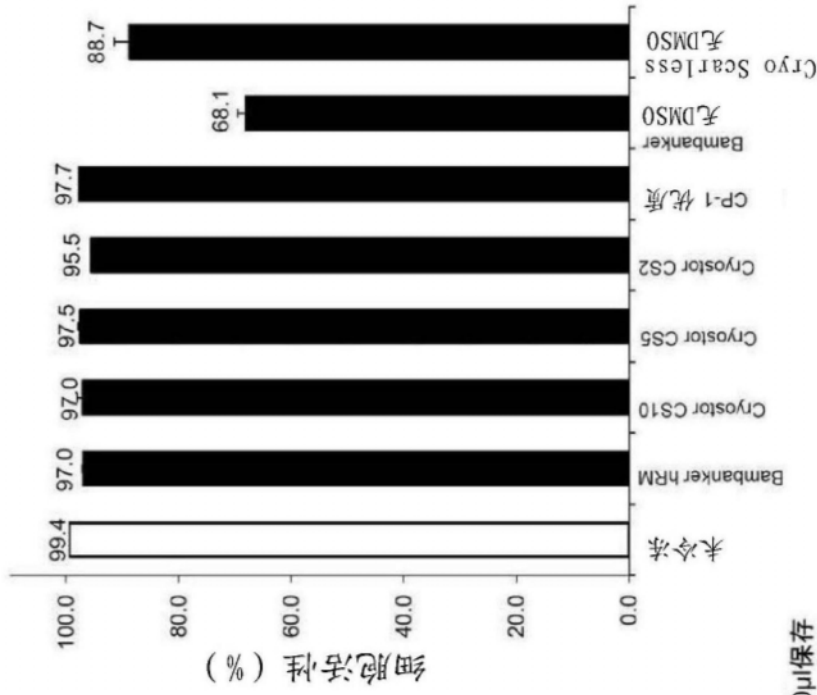


图25

复苏时的活细胞率 (4°C 开始)

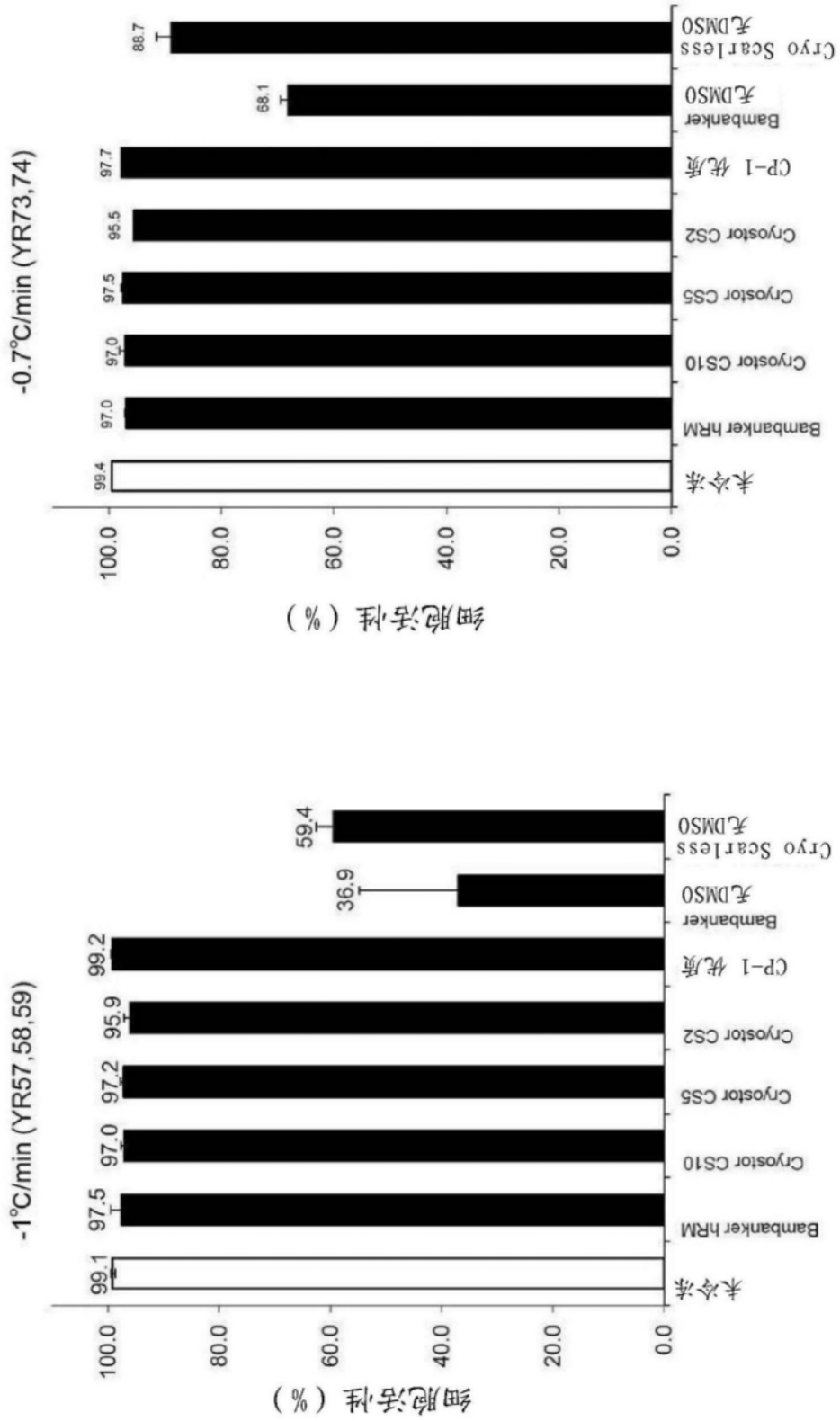


图26

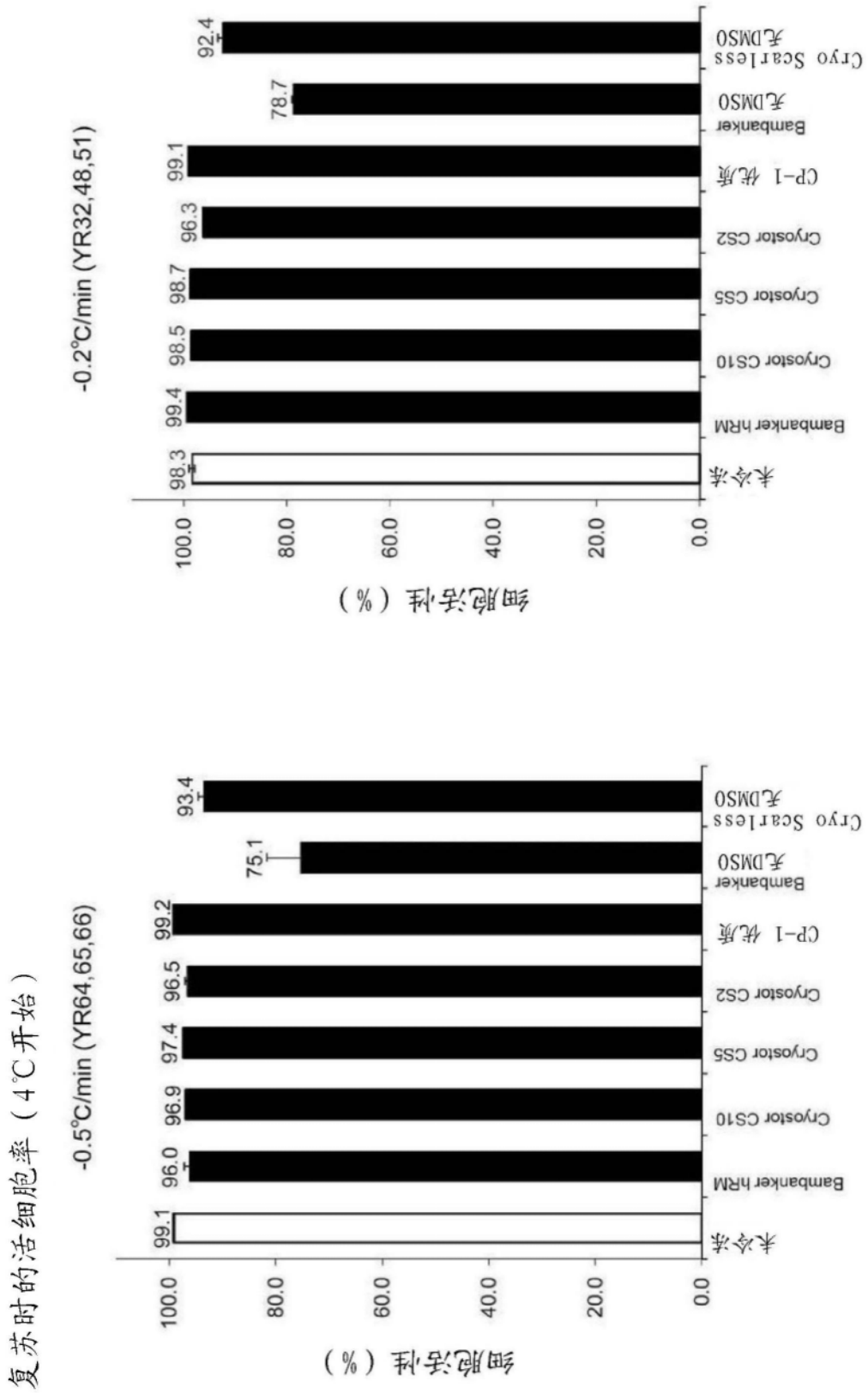
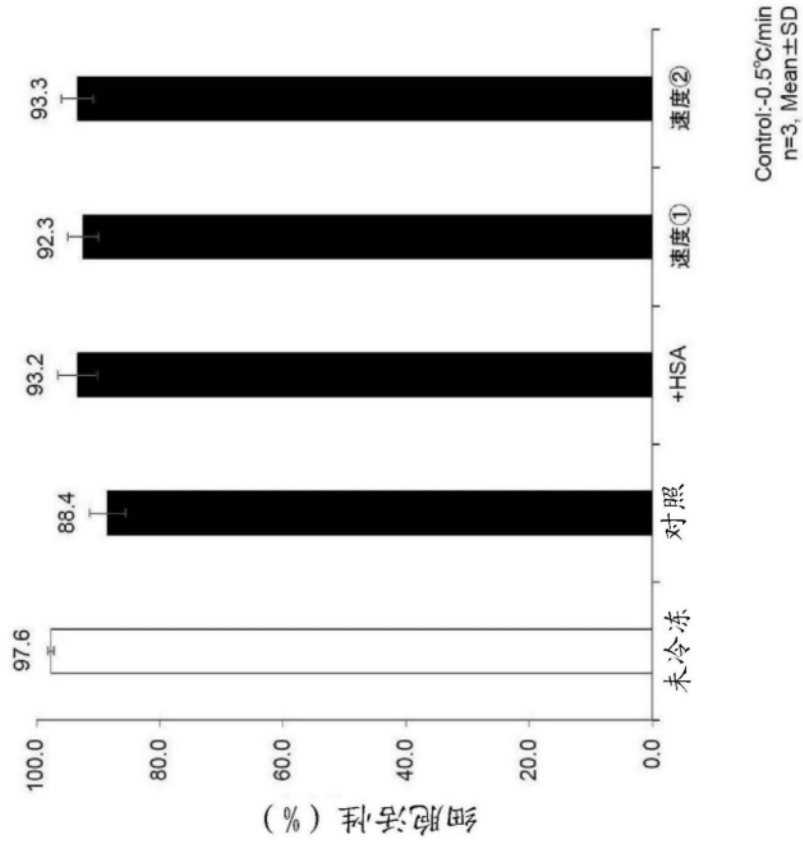


图27

YR75,84,88 复苏时的活细胞率



	未冷冻	对照	+HSA	速度①	速度②
YR75	98.1	85.1	93.7	91.8	95.2
YR84	97.2	89.9	96.2	90.2	94.3
YR88	97.4	90.3	89.9	95.0	90.4
Ave.	97.6	88.4	93.2	92.3	93.3

图28

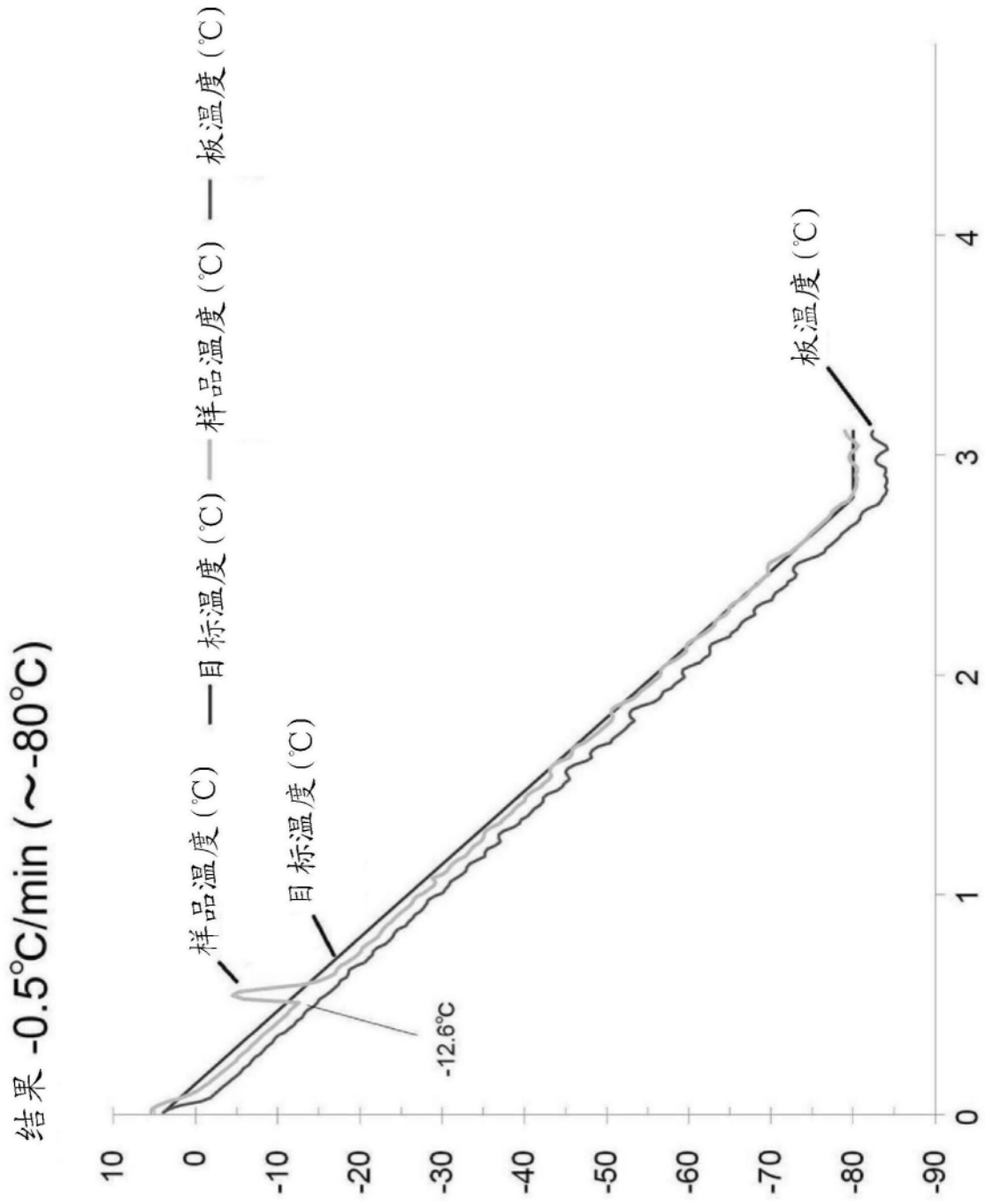


图29

结果 -0.5°C/min (~-10°C), 110min hold (-10°C), -1.0°C/min (~-80°C)

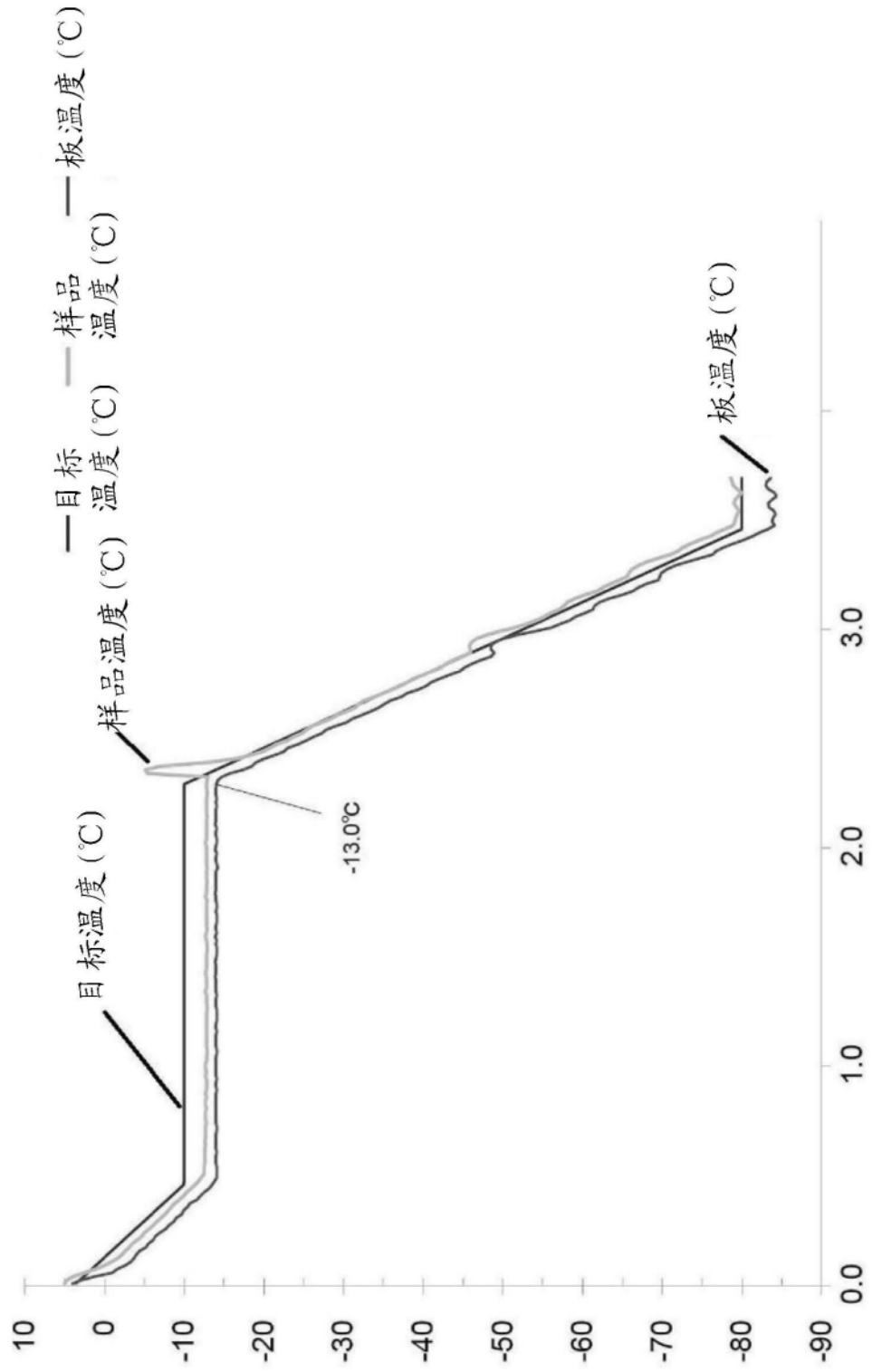


图30

